

Produksjon av beta-emitteren lutetium-177 (Lu-177) ved nøytronbestråling og merking til peptider med medisinsk anvendelse

Hovedoppgave i galenisk farmasi

Tharsika Aniklet



Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet
UNIVERSITETET I OSLO
Våren 2013

Produksjon av beta-emitteren lutetium-177(Lu-177) ved nøytronbestråling og merking til peptider med medisinsk anvendelse

Masteroppgave i galenisk farmasi

av

Tharsika Aniklet

Veiledere

Sindre Hassfjell

Bente Tange Harbø

Hanne Hjorth Tønnsen

Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet
UNIVERSITETET I OSLO
Våren 2013

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved isotopavdelingen i Institutt for energiteknikk, Kjeller i samarbeid med Farnasøytisk Institutt. Oppgaven er utført i perioden mars 2012 til april 2013 og det er siste del av et femårig studium i farmasi ved Universitetet i Oslo.

I forbindelsen med denne oppgaven ønsker jeg å takke mine veiledere Sindre Hassfjell, Bente Tange Harbø og Hanne Hjorth Tønnesen for god veiledning, hjelp og tilbakemeldinger underveis i arbeidet med oppgaven. En stor takk til Sindre Hassfjell for god veiledning på laben og for det skriftelige arbeidet. Jeg ønsker å takke Bente Tange Harbø og Hanne Hjorth Tønnesen for god veiledning til det skriftelige arbeidet.

Jeg vil gjerne takke Kristin Fure og Liv Stavsetra for god hjelp med germanium detektoren på laben.

Jeg ønsker å takke Helge Stray og Sissel O. Vigg for god opplæring til væskechromatogram systemet.

Jeg vil gjerne takke mine venninner for fem gode år på Blindern med mange gode minner. Dere har vært en stor støtte for meg.

Til slutt vil jeg gjerne takke min familie for god støtte gjennom hele studiet.

Oslo, juni 2013

Tharsika Aniklet

Sammendrag

Introduksjon: Lu-177 er en radioaktiv isotop av grunnstoffet lutetium, som er egnet for radionuklideterapi (RNT) av kreft. For å oppnå anrikning av radionukliden i kreftvev må den festes stabilt til et målsøkende molekyl. Molekyler som anrikes i kreftvev kan være forskjellige peptider og proteiner. For å feste Lu-177 stabilt til et slikt molekyl kan man ta i bruk bifunksjonelle chelatorer, for eksempel p-SCN-Bn-DOTA. TOC er et peptid som ligner på peptid hormonet, somatostatin. En del studier har vist at nevroendokrine tumorer uttrykker høy grad av somatostatin reseptorer, spesielt type 2. Det kan man utnytte for å administrere høy lokal dose til tumorvev slik at opptaket i resten av kroppen blir minst mulig.

I dag er det ikke mulig med radionuklideterapi for å behandle nevroendokrine tumorer i Norge. Folk som er rammet av nevroendokrine tumorer må dra til Sverige eller Danmark. I dagens samfunn er det økt forekomst av nevroendokrine tumorer og det er et økende behov for slike behandlinger i Norge. På grunn av det er reaksjonskinetikken og stabiliteten til Lu-177-DOTATOC komplekset undersøkt i denne masteroppgaven for å få kunnskap som er nødvendig for å formulere det til et preparat. I tillegg ble det utført noen merkingsforsøk med Tb-160, en tracer for Tb-161 som er en alternativ terapinuklide. Dette er utført i samarbeid med Farmasøytisk institutt og isotopavdelingen i Institutt for energiteknikk, Kjeller.

Mål: Målet med denne oppgaven er å gjennomføre en farmasøytisk produksjon av Lu-177-DOTATOC med kompleksdanning og nødvendige kvalitetskontroller, samt undersøke reaksjonskinetikken og stabiliteten til Lu-177-DOTATOC komplekset, og formulere et ferdig produkt.

Materialer og metoder: For å undersøke reaksjonskinetikken til Lu-DOTATOC komplekset er TLC og HPLC brukt. Det er separasjonsteknikker som skiller fritt Lu^{3+} fra Lu-177-DOTATOC komplekset og mengden av utgangsstoffene og produktet bestemmes ved å detektere radioaktiviteten til Lu-177. Radioaktiviteten er detektert ved hjelp av Ge-detektor. FFE er brukt til å rense reaksjonsløsningene slik at mesteparten av fritt Lu^{3+} som er til stede etter reaksjonene fjernes.

Resultater: I begynnelsen ble det gjort noen innledende forsøk for å finne egnede reaksjonsbetingelser og elueringsmetoder. Reaksjonskinetikken til Lu-177-DOTATOC og Tb-160-DOTATOC er undersøkt. Det er jobbet mest med Lu-177-DOTATOC.

Reaksjonskinetikken er undersøkt både ved romtemperatur og ved 87 °C. Kompleksdannelsen foregår mye raskere ved 87 °C og det er mulig å oppnå høyt utbytte(kompleksdannelse) med et molforhold på 2 mellom utgangsstoffene (DOTATOC og Lu-177). PC med 50 % acetonitril i vann og TLC med 1M ammoniumacetat og metanol (1:1 v/v) er ikke egnet for å skille fritt Lu^{3+} -177 og Lu-177-DOTATOC. TLC med 0,1M Na_3sitrat fungerer bedre.

Stabilitetsstudie er blitt utført både ved romtemperatur i åtte dager og ved 40 °C i fire dager. Stabiliteten til Lu-177-DOTATOC er undersøkt i 0,9 % NaCl både med og uten 1mg/ml og 7mg/ml askorbatløsning. Resultatene viser høy stabilitet til komplekset i opptil åtte dager ved romtemperatur med 7mg/ml askorbatløsning tilstede. Uten askorbat er stabiliteten til komplekset lavere både for komplekser med aktivitet på 540MBq/ml og 100MBq/ml. Resultatene fra stabilitetsstudie som ble utført ved 40 °C er ikke helt sikre siden varmeskapet ikke fungerte optimalt. Disse bør gjennomføres på nytt.

Konklusjon: Reaksjonskinetikken til Lu-177-DOTATOC er påvirket av temperatur. Ved romtemperatur går det flere dager før komplekset er dannet, mens det er mulig å oppnå komplett kompleksdannelse ved 87 °C etter 45minutter. TLC med 0,1M natriumsitrat er en god metode for å skille fritt Lu^{3+} -177 fra Lu-177-DOTATOC komplekset. HPLC kan benyttes for å skille fritt Lu^{3+} -177 og DOTATOC fra Lu-177-DOTATOC komplekset. Disse komponentene har ulik retensjonstid og HPLC systemet kan også benyttes for å identifisere komponentene ut ifra forskjellige UV-signaler.

Komplekset er stabilt i opptil åtte dager ved romtemperatur med en radioaktivitetskonsentrasjon tilsvarende en terapeutisk formulering hvis 7mg/ml askorbatløsning er til stede. Uten 7mg/ml askorbatløsning faller stabiliteten til komplekset mye raskere. Stabilitetsstudiet ved 40 °C bør gjennomføres på nytt siden varmeskapet ikke fungerte optimalt under studiet.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Forkortelser.....	2
1.3	Hensikt.....	2
2	Teori	5
2.1	Lantanoider	5
2.2	Produksjonsmetoder	5
2.3	Somatostatin (SST).....	8
2.4	DOTA-D-Phe ¹ -Tyr ³ -Octreotide(DOTATOC).....	9
2.5	Lu-177-DOTATOC	10
2.6	Merkingskjemi.....	11
2.6.1	Kompleksdannelse	12
2.7	Radiobiologisk effekt	12
2.7.1	Partiklenes rekkevidde	13
2.8	Deteksjonsmetoden.....	14
2.9	Usikkerhet ved måling av radioaktivitet.....	15
2.10	Håndtering av radioaktivitet	16
2.11	Kvalitetssikring.....	16
2.12	Utprøving av Terbium-160 (Tb-160) som tracer for Tb-161	17
3	Ekspperimentelt.....	Error! Bookmark not defined.
3.1	Materialer.....	19
3.1.1	Løsninger.....	21
3.1.2	1M Ammoniumacetat.....	21
3.1.3	45mg/ml Askorbatløsning, pH:5	21
3.1.4	Kald 0,1M LuCl ₃	21
3.1.5	0,2M NaCH ₃ COO	21
3.1.6	0,9% NaCl	22
3.1.7	1M NaOH.....	22
3.1.8	0,1M Sitronsyre.....	22
3.1.9	0,1M NaSitrat	22
	Tilberedning av Lu-177 og Tb-160 løsning	22

3.2	Metoder.....	23
3.2.1	Analysemetoder.....	23
3.2.2	Beregning av kompleksutbytte og standardavvik for tellehastigheten.....	25
3.2.3	High Performance liquid chromatography (HPLC).....	26
3.2.4	Fast fase ekstraksjon (FFE).....	27
3.2.5	Væskescintillasjonstelling.....	28
3.3	Forsøksoppsett.....	28
3.4	Stabilitetsstudie.....	29
3.4.1	Stabilitetsstudie ved romtemperatur (25 °C).....	30
3.4.2	Stabilitetsstudie ved 40 °C.....	30
3.5	Oppsamling og måling av væskescintillasjonsprøver	31
4	Resultater og diskusjon	32
4.1	Del 1: Innledende forsøk	32
4.1.1	Analyse av Lu ³⁺ -177 løsning.....	37
4.1.2	Reaksjonskinetikk ved romtemperatur.....	39
4.1.3	Reaksjonsblandinger med ulike molforhold mellom DOTATOC og Lu-177 ...	42
4.1.4	Analyse av Terbium (Tb)-160.....	43
4.1.5	Reaksjon mellom Tb-160 og DOTATOC.....	44
4.1.6	TLC med 1,0M ammoniumacetat og metanol (1:1 v/v).....	48
4.1.7	High Performance liquid chromatography (HPLC).....	49
4.2	Fast fase ekstraksjon (FFE)	51
4.3	Del 2: Stabilitetsstudie ved romtemperatur (25 °C).....	52
4.4	Stabilitetsstudie ved 40 °C	54
4.5	Oppsamling og måling av væske scintillasjonsprøver	56
5	Konklusjon	58
6	Forslag til videre arbeid.....	60
7	Referanseliste	61
8	Vedlegg	64

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

I dagens samfunn er det økt forekomst av nevroendokrine tumorer, noe av årsaken til det er økt levealder og forbedret deteksjonsmetoder. I Norge forekommer det 650 nye tilfeller av nevroendokrine tumorer per år (Oncolox 2012). Nevroendokrine tumorer utvikles fra nevroendokrine celler som finnes i mange forskjellige organer i kroppen for eksempel lunger, mage, tynntarm og tykktarm. Nevroendokrine tumorer kan forekomme i alle aldersgrupper, men insidensen er høyest fra 50 års alderen (Oberg, Knigge et al. 2012).

Nevroendokrine tumorer behandles med somatostatin (SST) analoger, bioterapi (α -interferon), kirurgi og kjemoterapi. Disse behandlingsalternativene er ikke optimale i alle tilfeller og noen må behandles med strålebehandling. Noen typer av nevroendokrine tumorer uttrykker høy grad av SST- reseptorer, spesielt type 2 i forhold til andre organer i kroppen. Det kan man utnytte til å administrere høy lokaldose med radioaktivitet som hemmer veksten til tumoren. Radionuklidene målstyres til tumorvevet ved hjelp av SST-analoger som er bundet til en chelator. Radionuklidene som er blitt undersøkt er Yt-90 og Lu-177. Resultater fra en del studier viser at behandling av nevroendokrine tumorer med levermetastase ved hjelp av reseptorspesifikk nukleærmedisinsk (RSNM) behandling har gitt gode resultater (Oberg, Knigge et al. 2012). Det er per i dag ikke mulig med RSNM behandling i Norge. Pasienter som trenger den type behandling må til Sverige der Lu-177 brukes (Oncolox 2012). Det er dermed et behov for økt tilgang til slik behandling i Norge.

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for energiteknikk (IFE), Kjeller som har en avdeling for produksjon av radioaktive legemidler. I oppgaven ble reaksjonskinetikken og stabiliteten til Lu-177-DOTATOC komplekset undersøkt. Reaksjonskinetikken er undersøkt ved romtemperatur og 87 °C. Stabiliteten til komplekset er undersøkt i isoton natriumklorid løsning både med og uten askorbat.

1.2 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven er å gjennomføre en farmasøytisk produksjon av Lu-177-DOTATOC med kompleksdanning og nødvendige kvalitetskontroller, samt undersøke reaksjonskinetikken og stabiliteten til Lu-DOTATOC komplekset, og formulere et ferdig produkt.

1.3 Forkortelser

A: Atommasse

ACN: Acetonitril

ALARA: As Low As Reasonably Achievable

cps: Counts per sekund

DNA: Deoksyribonukleinsyre

DOTA: 1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetra-acetic acid

DOTATOC: DOTA-D-Phe¹-Tyr³-Octreotide

DTPA: Dietylen-triaminpentaacetat

FFE: Fast fase ekstraksjon

Ge: Germanium

GMP: Good Manufacturing Practice

Hf: Hafnium

HFB: Heptafluorobutyric acid

HPLC: High performance liquid chromatography

IFE: Institutt for energiteknikk

LAL:

LET: Linear energy transfer

Lu: Lutetium

n: Nøytron

Naacetat: Natriumacetat

Na₃sitratt: Natriumsitratt

NaI: natriumjodid

NT: Nettotelletall

NT/t: Desintegrasjons hastighet

NOTA: Triazacyclononane-N,N',N''- triacetat

p: Proton

PC: Paper chromatography

RNT: Radionuklideterapi

RSNM: Reseptorspesifikk nuklærmedisinsk

SST: Somatostatin

TETA: Tetraazacyclotetradecane- N,N',N'',N'''-tetraacetate

TLC: Thin layer chromatography

Si: Silisium

t: Telletiden, sekunder

Yb: Ytterbium

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

Benevninger:

Bq: Becquerel (henfall per sekund)

eV: elektronvolt

keV: kilo elektronvolt

MeV: Mega elektronvolt

μm : Mikrometer

2 Teori

2.1 Lantanoider

Lu-177 er en radioaktiv isotop av grunnstoffet Lu (lutetium), tilhørende lantanoidgruppen i periodesystemet som består av 15 grunnstoffer. Lutetium er et metall og det finnes isotoper med atommasse (A) fra 150 til 184. Av disse er Lu-175/176 stabile (Lieser 2001).

Lu-177 henfaller til grunntilstanden til Hf-177 ved å sende ut en β^- -partikkel, et antinøytrino og påfølgende γ -stråler. Det er ustabile nuklider med et høyt antall av nøytroner i kjernen som henfaller ved å sende ut en β^- -partikkel. Henfallet skjer ved at et nøytron (n) i kjernen transformeres til et proton (p), $n \rightarrow p + \beta^- + \bar{\nu}$ (J.Magill, G.Pfenning et al. 2006).

Man ønsker å ta i bruk Lu-177 til produksjon av radiofarmaka siden det har egenskaper som er godt egnet til det formålet. De fleste av de utsendte β^- -partikler har en middelenergi på 149 keV og maksimal energi på 498 keV som gir en middelrekkevidde i vev på ca 0,3 mm og en maksimalrekkevidde på ca 1,5 mm. I tillegg til det blir det sendt ut γ -stråling med forholdsvis lav energi, 208 keV og 113 keV. Disse kan benyttes for in-vivo lokalisering av tumor vev med SPECT, mens β^- -partikkel emisjon kan gi terapeutisk effekt (Chakravarty, Das et al. 2010, Audicio, Castellano et al. 2011).

Tabell 2.1: Oversikt over β^- -partikler og γ -strålinger til Lu-177.

β^- -partikkel(%)	Energivåer, (maks.) keV	γ -stråling, %	Energivåer, keV
78,6	497	6,4	113
9,1	384	11	208
12,2	176		

2.2 Produksjonsmetoder

Lu og mange lantanoider har store reaksjonstverrsnitt for innfangning av termiske nøytroner, og er dermed egnet som utgangsmaterial for produksjon av β^- -partikkel emitterende radiolantanoider. Det er derfor hensiktsmessig å produsere ^{177}Lu i kjernereaktorer. Noen forsøksreaktorer i verden har kapasitet til slik radionuklideproduksjon, bl a IFE sin JEEP II på

Kjeller. Maksimal spesifikk aktivitet ved produksjon er avhengig av tverrsnittet til utgangsmaterialet, dets halveringstid og naturlig forekomst (Cutler, Smith et al. 2000).

Produksjonsformelen for radionuklider ved nøytroninnfangning i en reaktor:

$$D = \lambda N = m/MN_A \sigma \phi (1 - e^{-\lambda \tau}) e^{-\lambda t}$$

Lu-177 kan produseres ved direkte nøytroninnfangning, $^{176}\text{Lu}(n, \gamma) ^{177}\text{Lu}$. I denne metoden blir Lu, gjerne isotopanrikt med Lu-176, bestrålt med nøytroner i 6-7 dager eller mer. Det er mulig å lage store mengder Lu-177 på grunn av høyt reaksjonstverrsnitt ($2100\text{E-}24\text{ cm}^{-2}$). Både målmaterialet og produktet er isotoper av samme grunnstoff og etter bestrålingen vil produktet derfor inneholde en del ikke-radioaktiv Lu. Dette resulterer i noe lav spesifikk aktivitet for Lu-177 og ved binding til biologisk agens (antistoff/peptider) vil det kunne oppstå Lu-kation konkurranse (Lu-176 vs. Lu-177) (Horwitz, McAlister et al. 2005). Den metastabile radioisotopen, Lu-177m blir også dannet, men i langt mindre mengder ($7\text{E-}24\text{ cm}^{-2}$). Lu-177m har halveringstid på 160.1 dager og henfaller ved å sende ut β^- partikler (200 keV) og γ -stråler (414 keV, 319 keV og 122 keV). Lu-177m vil være tilstede som en forurensning og skape langlivet radioaktivitet i pasientene og langlivet radioaktivt avfall (Cutler, Smith et al. 2000, Chakravarty, Das et al. 2010).

Man kan også produsere Lu-177 ved indirekte nøytroninnfangning som gir høy spesifikk aktivitet og tilnærmet bærerfritt produkt. Ved å bestråle et target av ytterbium får vi reaksjonen: $\text{Yb-176}(n, \gamma)\text{Yb-177}$ som har et reaksjonstversnitt på $2.4\text{E-}24\text{ cm}^{-2}$. Yb-177 desintegrerer med emisjon av β^- -partikler og med en $t_{1/2}$ på 1.9 timer til Lu-177. Her vil det også være fordelaktig å benytte Yb isotopanrikt med Yb-176 for å minske mengden med targetmateriale og øke den spesifikke aktiviteten i produktet. Denne metoden krever en omfattende separasjon av Lu-177 fra utgangsmaterialet (Yb) slik at produktet får høy spesifikk aktivitet. Hvor bærerfritt produktet blir, avhenger av hvor god separasjonsmetoden er og hvor rent targetmaterialet er i utgangspunktet. Det vil også bli dannet Yb-175 som desintegrerer med emisjon av β^- -partikler og med en $t_{1/2}$ på 4.2 dager til stabilt Lu-175. Dette bidrar til å senke den spesifikke aktiviteten. I tillegg vil det også dannes radioaktivt Yb-169 som kan være en langlivet kontaminant. Slike tilnærmet bærerfrie produktløsninger krever lite

av biologiske agens for å oppnå en gitt pasientdose, siden det er lite av andre lantanoider som konkurrerer med Lu^{3+} -177 (Horwitz, McAlister et al. 2005).

Ved nøytroninnfangning blir det dannet lite av Lu-177 i forhold til utgangsmaterialet, Yb. Det er utfordrende å skille Lu-177 fra utgangsmaterialet siden begge har lik ladning og like kjemiske egenskaper. I tillegg til det er Lu-177 i mikromengder, mens utgangsmaterialet er i makromengder. Det er publisert separasjonsmetoder som benytter ionebytterkromatografi og væskeekstraksjon i flere trinn, og en metode hvor Yb fjernes ved amalgamering i en elektrolysecelle. I sistnevnte metode er katoden Hg (kvikksølv) og anoden er Pt (platina). I denne cellen blir Yb^{3+} redusert til Yb^{2+} som beveger seg fortrinnsvis til katoden og danner amalgam med Hg. Mesteparten av Yb^{3+} i cellens løsning vil bli fjernet, mens Lu^{3+} blir værende. Det er mulig å gjenta prosessen for å oppnå høy renhet av Lu^{3+} (Chakravarty, Das et al. 2010). Det finnes en annen metode som bygger på ekstraksjonskromatografi. Prosessen omfatter eluering av stamløsningen på en kolonne med 2-etylheksyl 2-etylheksylfosforsyring (HEH[EHP]) adsorbent på Amberchrom CG-71 (inert polymer) og deretter oppkonsentrering på en kolonne med tetra (1-oktyl)-3-oxapentan-1,5-diglykolamide også adsorbent på Amberchrom CG-71. Lu-177 elueres til slutt med 0.05 M HCl (Horwitz, McAlister et al. 2005).

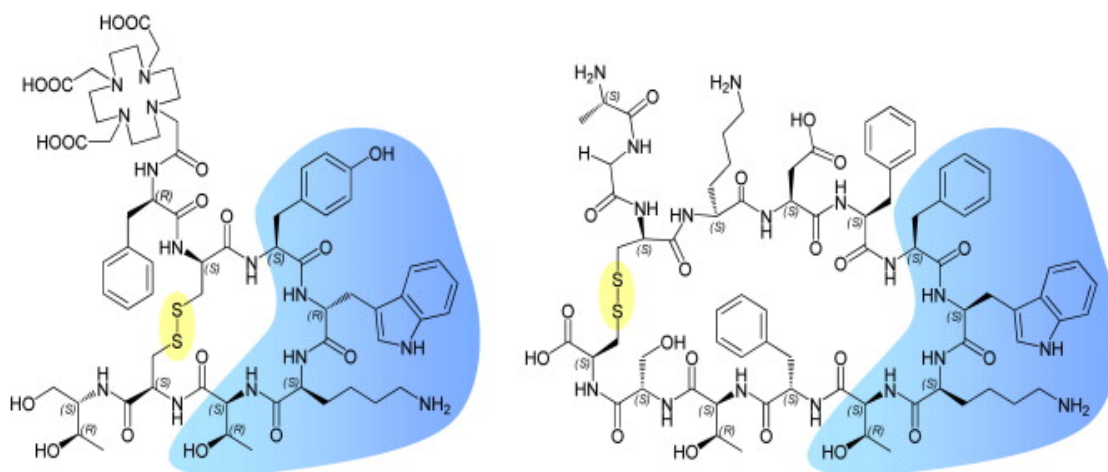
Lu 175 97.41 σ 63	Lu 176 2.59 σ 2 + 2100	Lu 177 <div> <div>160.1 d β^- 0.2</div> <div>6.71 d β^- 0.5</div> </div>	
Yb 174 31.8 σ 63	Yb 175 4.2 d β^- 0.5	Yb 176 12.76 σ 3.1	Yb 177 1.9 h β^- 1.4

Figur 2.1: Figuren viser de to mulige produksjonsmetodene. Gul pil: direkte produksjon. Rød pil: indirekte produksjon (J.Magill, G.Pfenning et al. 2006).

Alternativ kunne Lu-177 vært produsert i akseleratorer i en Yb-176(d,n)Lu-177 reaksjon, men det ville også bli produsert en del langlivet Lu-radioaktivitet (Dvoráková 2007). Det er ingen muligheter for å lage generatorer for Lu-177 da det ikke er noen potensielle langlivede mor-nuklider.

2.3 Somatostatin (SST)

Somatostatin (SST) er et peptid hormon som eksisterer i to aktive former: SST-14 og SST-28. SST produseres i hypothalamus, av mange forskjellige celler i perifere nerveceller og i sentralnervesystemet. Det forekommer også i perifere organer. SST fungerer som neurotransmitter og regulator av veksthormonfrisettingen fra hypofysen. I tillegg til det regulerer SST eksokrin og endokrin sekresjon i mange organer for eksempel bukspyttkjertelen (pankreas), mage/tarm og skjoldbruskkjertelen (thyroidea). Det påvirker også cellevekst og differensiering. SST betegnes som organismens universelle hemmer siden det i høy grad utøver en hemmende effekt på sekresjon og proliferasjon. SST binder seg til SST-reseptorer som inndeles i fem grupper. Disse uttrykkes av mange celler i forskjellige vev, for eksempel lunge, bryst, lever, milten og placenta. Uttrykk av disse reseptorene kan reguleres av mange hormoner, vekstfaktorer og sykdomstilstander. Nevroendokrine svulster uttrykker et høyt nivå av SST-reseptorer og de som forekommer i magens slimlag (mucosa), tynntarm og tykktarm, rektum og pankreas kalles for nevroendokrine gastroenteropankreatiske svulster. En svulst kan uttrykke flere subtyper i ulik grad, det er høy frekvens av SST-reseptor type 2. På grunn av det gjenkjennes disse svulstene ved hjelp av SST-reseptorene. I dag behandles nevroendokrine svulster med SST-analoger, bioterapi (α -interferon), kirurgi og kjemoterapi. Figur 2.2 viser strukturen til SST-14 og DOTATOC (SST-analog). Disse alternativene gir ikke så gode effekter ved alle former av nevroendokrine svulster. Man tar i bruk SST-analoger istedenfor somatostatin siden det har veldig kort halveringstid (1-2min). SST og SST-analoger utøver antitumoraktivitet ved å hemme frigjøringen av vekststimulerende peptidhormoner fra både tumor og normalt vev. Dokumentasjon fra kliniske studier viser at SST-analoger ikke har så god antitumor effekt. Man har derfor gått videre med dette og bundet radioaktive nuklider til SST-analogene. Prinsippet går ut på at SST-analogen skal fungere som et målsøkende molekyl (targeting) slik at det bindes til tumorcellene og radioaktiviteten fra radionukliden vil skade tumorcellene (Hofsli 2002).



Figur 2.2: Figuren viser struktur av DOTATOC (til venstre) og SST-14 (til høyre). DOTA er en chelator, mens TOC er et peptid som er bygd opp av aminosyrene fenylalanin, cystein, tyrosin, tryptofan, lysin, threonin, cystein og treoninol (Otte, Jermann et al. 1997). Det området som er farget er den delen av molekylet som binder seg til SST-reseptorene (Zoller, Eisenhut et al. 2009).

2.4 DOTA-D-Phe¹-Tyr³-Octreotide (DOTATOC)

DOTA står for 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic acid. DOTA består av fire tertiære aminer og fire karboksylsyrer i en ringstruktur. En av karboksylsyre gruppene i DOTA kan aktiveres slik at det blir til en esterbinding som kan inngå i videre reaksjoner.

DOTA med esterbinding kan reagere med primære aminosyrer (stort sett lysin) i et peptid/protein slik at det dannes DOTA-peptid/protein konjugat via stabil amidbinding.

Denne mekanismen kan benyttes til å binde TOC (SST-analog) til DOTA. TOC vil fungere som et målsøkende molekyl, mens DOTA kan danne komplekser med metallioner som lokaliseres i midten av ringen. Ut i fra en del forsøk har man sett at det egner seg for metaller med ladning 3+ og ioneradius på ca 10 nm, for eksempel Indium (In³⁺) og lantanoider (Ln³⁺).

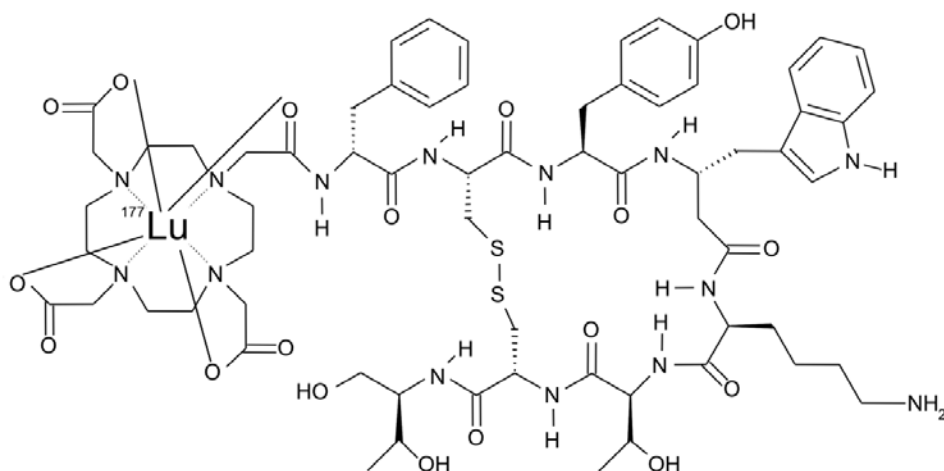
DTPA (dietylntriaminpentaeddiksyre) har ikke ringstruktur, men har de samme bindingsgruppene som DOTA slik at det også kan danne kompleks med metallioner. DTPA er brukt i [In-111]-DTPA-octreotid (Octreoscan®) for å avbilde og diagnostisere somatostatin-reseptor-positive tumorer. DTPA-metallion-kompleks har ikke like stor kinetisk stabilitet *in vivo* som sykliske ligander. Syre eller kationer kan fremme destabiliseringen av anioniske komplekser *in vivo*. Under destabiliseringen vil de svake bindingene mellom metallionet og liganden bli brutt slik at metallionet frigjøres fra komplekset. Metallionet kan da tas opp av serumproteiner, beinvev, lever og gastrointestinal slimhinne, og gi uønsket stråledose til disse

organene. Opptak i beinvev forekommer ofte fordi fosfat-strukturen binder de fleste metallioner godt. Opptak i lever forekommer ved radiokolloid dannelse (Cutler, Smith et al. 2000).

2.5 Lu-177 og SST-analoger

Radiomerket somatostatin analoger er et nytt verktøy for å behandle pasienter med nevroendokrine tumorer som ikke kan opereres eller har kommet til metastasestadiet. I begynnelsen brukte man radiomerket somatostatin analoger for diagnostisering, for eksempel ^{111}In -DTPA-octreotid (Octreoscan®). Ut i fra disse studiene har man fått mer innblikk i toksiske effekter, for eksempel undertrykkelse av beinmarg (ved høye doser $> 100\text{GBq}$ som resulterer i $> 3\text{Gy}$ stråle dose for beinmarg) og nyrene. I noen tilfeller kan levertoksisitet også forekomme. Dette har resultert i utvikling av nye radiomerkede somatostatin analoger med modifiserte somatostatin analoger og chelatorer som danner mer stabile komplekser med radionuklidene (Kam, Teunissen et al. 2012).

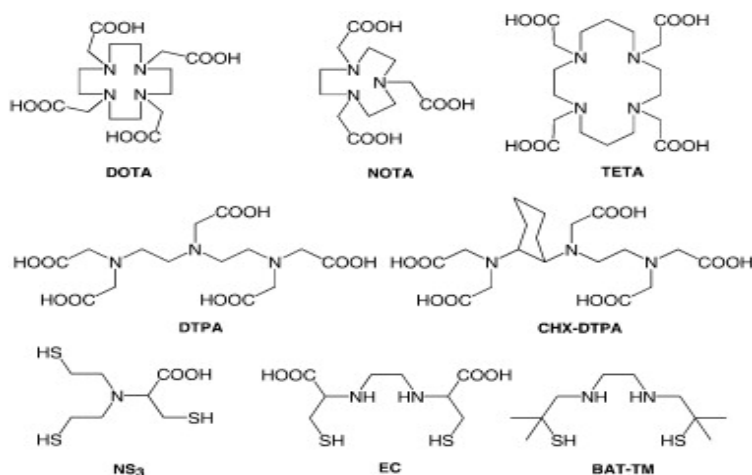
Før man begynner å behandle med Lu-177-baserte somatostatin analoger er det viktig å diagnostisere med ^{111}In -DTPA-octreotid (Octreoscan®), ^{68}Ga -DOTANOC eller ^{68}Ga -DOTATOC for å avbilde tumoren og undersøke om pasienten har høyt opptak i tumoren. Det er vanlig å administrere aminosyre infusjon under behandlingen for å beskytte nyrene, siden det hindrer renalt opptak av radioaktivitet. Det er utført studier med $^{177}\text{Lu}^{3+}$ bundet til forskjellige somatostatin analoger for eksempel $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]\text{octreotide}$, $[\text{Tyr}^3]\text{octreotide}$ (DOTATOC), $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]\text{octreotate}$ (DOTATATE) og $[\text{DOTA}^0 - 1 - \text{NaI}_3]$ (DOTANOC). DOTATOC og DOTATATE har veldig lik struktur, det som skiller disse to er c-terminal threoninol i DOTATOC som er byttet ut med threonine i DOTATATE (Kam, Teunissen et al. 2012). Strukturen til Lu-177-DOTATOC er vist i figur 2.3. Det er utført mange studier med de to sistnevnte analogene og i noen studier har man konkludert med at DOTATATE egner seg bedre enn DOTATOC siden det har høyere affinitet for SST-reseptor type 2 og høyere opptak i tumorvev (Esser, Krenning et al. 2006, Kam, Teunissen et al. 2012). Det er allikevel utført en del studier med DOTATOC siden de har veldig lik struktur og det finnes preparater med DOTATOC på markedet. I tillegg til det har man sett at opptak av DOTATOC i nyrene er redusert i forhold til DOTATATE, det kan kanskje være egnet for pasienter som ikke har nyrer som fungerer optimalt.



Figur 2.3: Det viser strukturen til Lu-177-DOTATOC komplekset.

2.6 Merkingsskjemi

Syntese av radiofarmaka til endoradioterapi er en et-trinn reaksjon der radionukliden bindes til egnet merkingskomponent (antistoff/peptid). Dette kan skje via radiohalogenering eller radiometall-kompleksdannelse ved bruk av bifunksjonelle chelatagenser. En vanlig metode for radiohalogenering av peptider eller antistoffer er via elektrofil aromatisk substitusjon på aminosyren, tyrosin med f. eks. I-125, I-131 eller At-211. Radiometall-kompleksdannelse utføres med makrosykliske chelatorer f. eks. DOTA, NOTA, TETA eller asykliske chelatorer f. eks. DTPA. Disse komponentene har høy likevektskonstant for kompleksdannelse (Zoller, Eisenhut et al. 2009). Strukturen til disse er vist på figur 2.4 under.



Figur 2.4: Oversikt over makrosykliske og asykliske chelatorer (Zoller, Eisenhut et al. 2009).

2.6.1 Kompleksdannelse

Reaksjon: Chelator + metallion \rightarrow chelator-metallion kompleks.

Hvis chelatoren i seg selv ikke har en målsøkende funksjon, må den før chelatering av et metallion bindes stabilt til et målsøkende molekyl. For å kunne binde en chelator med en stabil kovalent binding til et målsøkende molekyl må chelatoren påsettes en funksjonell gruppe. Denne funksjonelle gruppen sørger for at chelatoren kan bindes ved relativt milde betingelser til et amin eller en karboksylgruppe på det målsøkende molekylet. Deretter kan man danne det ønskede radioaktive metallion-chelator-kompleks. Stabiliteten av et metallkompleks påvirkes av størrelsen og ladningen til metallionet, hvilket koordinasjonstall den foretrekker og hvordan chelatoren er tilpasset dette. Stabiliteten øker med redusert størrelse av metall ionet og liganden (Saha 2010).

2.7 Radiobiologisk effekt

Ved endoradioterapi administrerer man en radionuklide konjugert til et peptid/antistoff. Radionukliden utøver den terapeutiske effekten ved hjelp av den ioniserende strålingen, mens peptidet/antistoffet leder nukliden til tumoren/sykt vev. For å utøve den terapeutiske effekten trenger ikke den radiomerkede komponenten å bli tatt opp i cellen, partikler som emitteres ved radioaktivt henfall interagerer også med celler som ligger i nærheten til target celler såfremt den utsendte strålingen har en rekkevidde på mer enn en cellediameter. Den terapeutiske effekten er dermed ikke bare begrenset til celler som uttrykker målreseptorene. Denne effekten betegnes som «crossfire effect» og er viktig for behandling av tumorer som

uttrykker heterogene antigener/reseptorer eller har lite vaskularisering (Zoller, Eisenhut et al. 2009). I tillegg til det kan man få såkalt «bystander effect», det går ut på at celler som er blitt utsatt for stråling kan indusere biologiske effekter i nabocellene som ikke er utsatt for stråling. Det kan oppstå via intercellulær kommunikasjon (stimulere p53 og P21 signalveiene) eller utsendelse av inflammatoriske komponenter for eksempel cytokiner og frie radikaler fra celler som er blitt utsatt for stråling. Det kan resultere i genetisk ustabilitet i nabocellene. Mekanismen for «bystander effect» er ikke fullstendig kartlagt (Zhernosekov, Filosofov et al. 2007, Zoller, Eisenhut et al. 2009).

Ioniserende stråling som emitteres av radionukliden må være høy nok til å bryte kovalente bindinger i essensielle biologiske molekyler slik at det resulterer i cellens død. LET(linear energy transfer) er energimengden som blir avsatt per lengdeenhet langs en partikkelbane. Radioaktiv stråling fører til radiolyse og det dannes radikaler som kan gi fragmentering av DNA. Cellene har mekanismer for å reparere en del DNA skader for eksempel enkel- eller dobbeltråd brudd. Den terapeutiske dosen er bestemt av egenskaper til radionukliden som halveringstid og henfallsstrålingen, hvor mye av energien som avsettes i tumor og biologisk halveringstid. I tillegg til det er det viktig med god kjennskap til tumorens morfologi (Zoller, Eisenhut et al. 2009).

2.7.1 Partiklenes rekkevidde

Den maksimale rekkevidden til partiklene er avhengig av deres karakter og energien som de bærer med seg. β --partikler med høy og lav LET kan bevege seg flere millimeter i vev og kan benyttes for å behandle store tumorer. α - partikkel emitterende radionuklider har veldig høy LET og kan dermed utøve stor skade på cellene. Rekkevidden til α -partikler er begrenset til noen få cellediametre ($< 100 \mu\text{m}$), og det er lite «crossfire effect». α -partikkel emitterende nuklider benyttes for å behandle gjenværende tumorervev etter operasjon og hematologiske sykdommer for eksempel leukemi. Auger elektroner som emitteres ved elektron innfangning og konversjon elektroner som sendes ut ved indre konversjon har medium LET verdier med en rekkevidde på typisk mindre enn en mikrometer (μm). Antallet av elektroner som sendes ut ved elektron innfangning eller indre konversjon er avhengig av hvilken radionuklide som henfaller. Siden disse elektronene har kort rekkevidde må radionukliden internaliseres i cellen ved sensitive targets, f eks direkte til DNA, for å være terapeutisk effektiv. Et eksempel på radionuklid som har høy terapeutisk effekt med slike elektroner er I (jod)-125 som har i

gjennomsnitt sender ut 20 elektroner ved hvert henfall. Lu-177 henfaller ved å sende ut β^- -partikler og har gjennomsnittlig rekkevidde på 0.23mm, målt i vann (Zoller, Eisenhut et al. 2009).

2.8 Deteksjonsmetoden

Radioaktiv stråling som trenger gjennom materie fører til ionisering av materialet. I hvilken grad ioniseringen oppstår er avhengig av type materiale og strålingens type og energi.

Radioaktiv stråling detekteres ved hjelp av strålingens evne til å ionisere. Alle detektorer er bygd opp av to hoveddeler der den ene delen er et strålingssensitiv volum for eksempel gass/krystaller som får varige eller kortvarige endringer når det treffes av stråling, mens den andre hoveddelen omformer endringene til signaler som gir utslag på et måleinstrument.

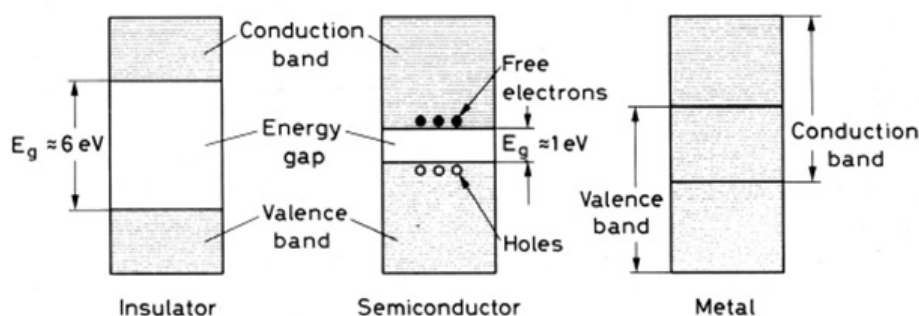
Detektorene kan inndeles i gassfylte detektorer (ionisasjonskammere, Geiger-Muller detektorer), scintillasjonsdetektorer (væske/krystaller) og halvlederdetektorer (Si og Ge) (Henriksen, Ingebretsen et al. 1995).

Scintillasjonsdetektorer og halvlederdetektorer har avansert elektronikk. De kan være bygd opp med en kollimator som er plassert foran krystallen og ha blyskjerming rundt detektoren for å optimalisere telling av en prøve. Scintillasjonsdetektorene har en fotomultiplikator som forsterker signalene som dannes ved ionisering, en rekke med faste kanaler, en krets for å omdanne analoge signaler til digitale signaler. Kanalene tilsvarer et lite energiområde og det benyttes for å bestemme energien til γ -strålene. Det gjøres ved å telle antall av γ -stråler som havner innenfor kanalene og lage et spektrum med kanaler på x-aksen og antall tellinger på y-aksen. Det blir som et stolpediagram og hvis det er mange γ -stråler innen for et eller flere bestemte energiområder vil det være klare toppler på diagrammet (Henriksen, Ingebretsen et al. 1995, Saha 2010).

Halvlederdetektorer består av krystaller av silisium eller germanium hvor strålingen som detekteres har sin energiavsetning. Disse krystallene egner seg godt til deteksjon av γ -stråler siden Si og Ge har valenselektroner med kort vei til ledningsbåndet, det betyr at elektronene i det ytterste (valens) skallet kan bli eksitert til ledningsbåndet ved lav energitilførsel (se figur 2.5). Forutsetningen er at energien som tilføres må være høyere enn energigapet mellom valensskallet og ledningsbåndet. Ved romtemperatur er det 1.09 eV for Si og 0.79 eV for Ge, mens energien som må tilføres for eksitasjon er 3.6 eV og 2.8 eV. På grunn av det lave

energigapet kan elektronene bli eksitert ved romtemperatur via termisk energi og skape støy. Dette vil også forstyrre deteksjon av radioaktiv stråling. For å hindre dette avkjøles krystallene med nitrogengass ned til rundt $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Henriksen, Ingebretsen et al. 1995, Lieser 2001).

Scintillasjonsdetektorer har et følsomt volum som sender ut lys ved ionisering. Det kan være uorganiske krystaller (NaI), organiske krystaller (antracen) og væsker (p-terfenyl i toluen). Krystallene må være gjennomsiktige slik at lys passerer gjennom (Lieser 2001).



Figur 2.5: Valensbånd og ledningsbånd for ulike materialer. Isolatorer(plast) krever høy energi for å flytte elektronene over til ledningsbåndet, mens begge båndene overlapper hverandre i metaller. Det er hovedforklaringen på metallenes egenskap til å lede strøm. Halvledere har lite gap mellom båndene slik at det ikke kreves mye energi for å flytte på elektronene. Dette gjør det mulig å detektore til og med γ -stråler med lav energi (Lieser 2001).

2.9 Usikkerhet ved måling av radioaktivitet

Radioaktive hendelser er et statistisk fenomen og for et stort antall radioaktive atomer følger Poisson-fordelingen. Hvis man teller en langlivet nuklide flere ganger under identiske betingelser, kan man beregne gjennomsnitt for disse (desintegrasjons hastighet, NT/t) verdiene. Spredningen til gjennomsnittet kan angis som standardavvik og kan beregnes som kvadratroten av gjennomsnittet. For store telletall kan man tilnærmelsesvis sette at en enkeltmåling er lik gjennomsnittet, og standardavviket vil da være kvadratroten av telletallet til prøven. Det bør ikke utgjøre $> 1\%$ (Lieser 2001).

Måling av radioaktivitet bør gjøres lenge for å få høye telletall som reduserer usikkerheten. Man må telle lenge spesielt for prøver som har lav radioaktivitet. Det kan være problematisk for nuklider med kort halveringstid. I slike tilfeller må man prøve å skjerme for bakgrunnsstråling slik at nettotelletallet for prøven blir høy (Lieser 2001).

2.10 Håndtering av radioaktivitet

Radioaktive løsninger skal håndteres etter bestemte betingelser for å forsikre gode arbeidsrutiner, skape trygg arbeidsmiljø og unngå søl av radioaktivitet. Alle som skal jobbe med radioaktivitet må ha strålevernkurs før de begynner å arbeide.

Det er viktig å jobbe med radioaktive løsninger i eget rom der arbeidet foregår i avtrekkskap. I avtrekkskapet skal det være underlag med absorberende overflate og tilberedning av radioaktive løsninger skal foregå i brett som er merket med teip som har symbolet for radioaktivitet. I brettet skal det også være underlag med absorberende overflate. I en radioaktiv lab skal det alltid være en detektor som kan brukes for å sjekke aktiviteten i rommet, det er vanlig med en håndmonitor. Radioaktive løsninger med høy aktivitet skal plasseres bak blyblokker slik at operatøren ikke blir utsatt for unødvendig stråling. Arbeidet skal følge «As Low As Reasonably Achievable - ALARA» prinsippet slik at all eksponering blir så lav som rimelig mulig. Før man går ut av en radioaktiv lab skal man sjekke aktiviteten på hendene slik at søl kan oppdages (Lovdata 2010).

Ved håndtering/tilberedning av radioaktive løsninger skal vedkommende benytte to par av hansker, frakk og alltid ha på seg persondosimeter. Det er viktig å skifte hansker ofte siden de kan være gjennomtrengelige for radioaktive løsninger. Før man begynner med arbeidet er det viktig å finne frem all utstyret på forhånd og merke dem riktig. Man må være flink til å sortere avfall slik at radioaktiv avfall ikke havner på feil sted. Aktiviteten til avfallene kan man sjekke med håndmonitoren (Lovdata 2010).

Hvis det forekommer søl av radioaktivitet må man håndtere det på en forsvarlig måte. Det er viktig å melde fra til strålevern. Man må prøve å samle det uten å spre det utover stort område. Søl på hud vaskes bort med såpe og vann til et akseptabelt kontaminasjonsnivå (Lovdata 2010).

2.11 Kvalitetssikring

Lu-177-DOTAOC kompleks er formulert som en injeksjonsløsning for intravenøs administrasjon. Slike preparater har høye krav til sterilitet og kvalitetssikring. Under produksjonen må man jobbe aseptisk slik at kontaminasjonsfaren blir redusert. Det er i tillegg store krav til produksjonslokalene som inndeles i fire klasser, der klasse A er på toppen. I

klasse A er det veldig lavt innhold av partikler (partikler $> 0,5 \mu\text{m}$, maksimum: 3500, partikler $> 5,0 \mu\text{m}$, maksimum: 0) og mikroorganismer (synlige organismer: < 1 per kubikk meter luft). Det er viktig å undersøke partikkel- og støvmengden i lokalene. Operatører som skal arbeide i disse lokalene må ha opplæring i aseptisk arbeidsteknikk (Winfield and Richards 2004).

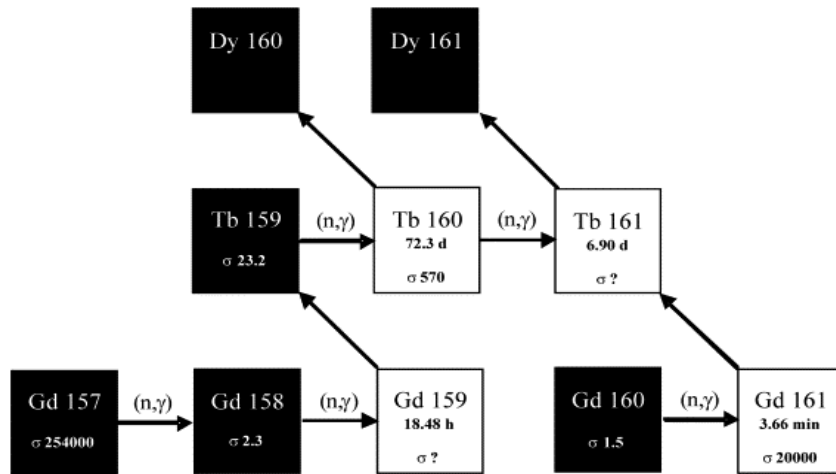
Ved produksjon skal man ha tre prøver i tillegg til den mengden man ønsker å produsere. Årsaken til det er at de tre prøvene skal benyttes for partikkelstørrelse kontroll, mikrobiell kontaminasjon, og LAL-test (Limulus Amebocyt Lysat-testen: påvisning av bakterielle endotoksiner) Det gjøres for å sikre kvaliteten til preparatene og for dokumentasjon.

Produksjon av radiofarmaka har flere krav enn det som er nevnt ovenfor. Lovverket som man må ta hensyn til ved produksjon av radiofarmaka er strålevernforskriften, GMP (Good Manufacturing Practise), Annex 3 (Guidelines on Good Manufacturing Practices for radiopharmaceutical products) og Annex 1 (Manufacture of Sterile Medicinal Products).

2.12 Utprøving av Terbium-160 (Tb-160) som tracer for Tb-161

Terbium er et grunnstoff som tilhører lantanoidene slik som lutetium. Tb-161 og Lu-177 har mange lignende egenskaper, for eksempel emitterer begge γ -stråler med lav energi og β^- partikler. Tb-160 har 73 dager som halveringstid og benyttes som en tracer for Tb-161 i disse forsøkene. Man tenker seg å bruke Tb-161 til kreftbehandling på samme måte som Lu-177.

Tb-161 kan også produseres bærerfritt (se figur 2.6). På grunn av lignende kjemiske egenskaper er Tb-161 kompatibel med eksisterende merkingsprosedyrer for Lu-177. Tb-161 har mye mer av konversjon og Auger elektroner i forhold til Lu-177 men liknende β^- partikkel emisjon. Konversjon- og Auger-elektronene har energi i området 3-50 keV og utgjør ca 27 % av energien ved β^- partikkel utsendelse. Allikevel har disse elektronene høy lokal dose tetthet på grunn av kort rekkevidde i vev ($0,5\text{-}30\mu\text{m}$) og kan dermed gi høye cytotoxisitet (Lehenberger, Barkhausen et al. 2011).



Figur 2.6: Figuren viser at det er mulig å produsere Tb-161 bærerfritt ved å bestråle Gd-160 med nøytroner slik at det dannes Gd-161 som henfaller til Tb-161 (Lehenberger, Barkhausen et al. 2011).

3 Materialer

DOTATOC(1µg/µl)	IFE, Kjeller
Lutetiumoksid(Lu ₂ O ₃), 99,995 %	Alfa Aesar
Terbium(III, IV)oksid(Tb), 99,998 %	Alfa Aesar
177-Lu, 1Gbp/100µl, kalibrert 130313, kl.12,00	ITG Isotope Technologies Garching GmbH Lichtenbergstr. 1 85748 Garching Germany Apotekproduksjon AS, Oslo
Sitronsyre	Merck, Germany
Natriumhydroksid, NaOH	Merck, Germany
Ammoniumacetat, NaCH ₃ COO	Sigma-Aldrich
Heptafluorobutyric(HFB) acid	
Diverse:	
pH papir	Macherey-Nagel, germany
Oljebad: Heigar Intermed	Gorud PF Hetotherm
5 x 10 TLC aluminium plater, silika gel 60	Merck Germany
3.00cm x 100m PC	Whatman, England. International Ltd
C18-kolonne	Teknolab AS, Kolbotn, Norge
C18-kolonne for HPLC:	
Accucore C18 150 x 2,1mm	
Partikkel størrelse: 2µm	
Gemini C18 150 x 2,0mm	Phenomenex
Partikkelstørrelse: 5µm	
Mikropipetter, 20µl	Blau Brand, IntraMark
Eppendorf rør, 2ml	Eppendorf Research
Pipetter, 10, 100, 1000µl	Eppendorf Research
Pipettespisser, 10, 100, 1000µl	Eppendorf Research
Filter 0,20µm	
Sprøyte 5ml	
Væskescintillasjonsglass	IFE, Kjeller
Luftballong	
Tynn plast slange	
Løsninger:	
Saltsyre, 37% HCL	Merck Germany
Eddik syre, 17,5M CH ₃ COOH	Merck Germany
Ammoniakk, 25% NH ₃	Merck Germany
Aceton, C ₂ H ₆ CO	Fluke chemie, GmbH, Sveits
Metanol, CH ₃ OH	Merck Germany
Etanol, CH ₃ CH ₂ OH	Merck Germany
Heptafluorobutyric(HFB) acid 10mM	IFE, Kjeller

3.1.1 Løsninger

3.1.2 1M Ammoniumacetat

15,42g ammoniumacetat ble veid ut på finvekt og løst opp i milliqvann. Dette ble overført til målekolbe og sluttvolumet ble 200ml. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

3.1.3 45mg/ml Askorbatløsning, pH:5

9,01g askorbat ble veid ut på finvekt, overført til en målekolbe og løst opp i litt milliqvann. pH-verdien ble justert til 5 med 1,26ml 6M HCL. Milliqvann ble tilsatt til 200ml. Askorbat er følsomt for lys, målekolben ble avskjermet for lys ved hjelp av aluminiumsfolie og løsningen ble oppbevart i kjøleskap.

3.1.4 Kald 0,1M LuCl_3

0,043g av Lu_2O_3 ble veid ut på finvekt og overført til et beger glass. Stoffet ble løst opp i 935 μl 6M HCl ved oppvarming. I begynnelsen var løsningen ugjennomsiktig og kritthvit, ved oppvarming ble løsningen klar slik at all mengden av Lu_2O_3 ble løst opp. Løsningen ble dampet slik at det ble krystaller av LuCl_3 på bunnen. Disse krystallene ble løst opp i 800 μl milliqvann som ble dampet bort. Det ble dannet krystaller igjen som ble løst opp med 2,14ml 50mM $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NH}_3$ slik at konsentrasjonen til Lu^{3+} ble 0,1M. pH ble målt med pH-papir, det ble 4.

3.1.5 0,2M NaCH_3COO

Denne løsningen ble lagd av 0,38M 94ml CH_3COOH og 2,03g NaOH som ble veid ut på finvekt. NaOH ble løst opp i milliqvann først, deretter ble begge blandet sammen til 250ml

som sluttvolum. pH-verdien ble målt med pH-papir, det ble tilnærmet fem. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

3.1.6 0,9% NaCl

2,52g av NaCl ble veid ut på finvekt og løst opp i milliqvann. Dette ble overført til målekolbe og sluttvolumet ble 250ml. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

3.1.7 1M NaOH

10,10g NaOH ble veid ut på finvekt og løst opp i milliqvann. Dette ble overført til målekolbe og sluttvolumet ble 250ml. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

3.1.8 0,1M Sitronsyre

4,80g sitronsyre ble veid ut på finvekt og løst opp i milliqvann. Dette ble overført til en målekolbe og sluttvolumet ble 250ml og løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

3.1.9 0,1M NaSitrat

15ml 1M NaOH og 100ml 0,1M sitronsyre ble blandet sammen i en målekolbe. pH-verdien ble undersøkt med pH-papir, det var rundt 4-5. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

3.1.10 Tilberedning av Lu-177 og Tb-160 løsning

Tb-160 er blitt produsert ved å bestråle terbium-159 med nøytroner. Målmaterialet er lagt i kvartgalssrør. En tykk slange er blitt brukt for å knekke kvartsglasset, det

Dette glasset knekkes ved å legge det i tykk slange slik at man ikke kutter seg. Deretter legges det i begerglass og varmes opp med konsentrert saltsyre (12M) som dampes vekk. Etter hvert tilsettes litt vann slik at terbiumklorid løses opp.

Det er blitt utført forsøk med Tb-160 under de samme betingelsene som ble brukt for Lu-177. Tb-160 i vann er blitt blandet med DOTATOC-løsning for å undersøke kompleksutbyttet og deretter sammenligne resultatene med forsøkene til Lu-177.

3.1.11 Tilberedning av stamløsning til Lu-177:

Ca. 3mg av Lu er bestrålt i 200h (8.3dager), produktet er i Lu_2O_3 form. Det løses i konsentrert HCl og man overfører løsningen til et annet glass for å fjerne alle glassbitene. Det er lurt å skylle glassbitene med HCl slik at man får med seg mesteparten av produktet. Deretter skal man dampe bort HCl, under denne prosessen blir Lu_2O_3 omdannet til Lu_2Cl_3 . Etter at all HCl mengden er dampet bort løses saltet i vann.

3.1.12 Stamløsninger av Lu-177:

Nr.1: 4.27mM, aktivitet: 1.4 G β q, dato:02.04.12

Nr.2: 1.51mM, aktivitet: 8.97 M β q dato: 7.05.12

Nr.3: 1.01mM, aktivitet: 2.5 GBq, dato: 27.06.12

Nr.4: 4mM, aktivitet: 8 GBq, dato: 18.12.12

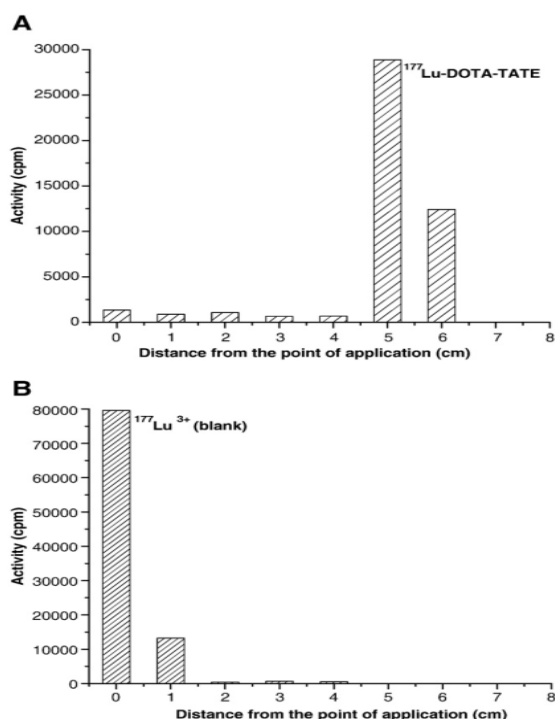
3.1.13 Stamløsning av Tb-160:

Nr.1: 1.07mM, aktivitet: 0,2 GM β q, dato: 14.09.12

3.2 Metoder

3.2.1 Analysemetoder

Metoden som er benyttet i forsøket er hentet fra en artikkel der reaksjonen mellom DOTATATE og Lu-177 undersøkes. Dette undersøkes ved hjelp av PC med 50 % acetonitril i vann. Komplekset vil følge elueringsmiddelet, mens fritt Lu-177 blir liggende igjen på appliseringspunktet. Forholdet mellom DOTATATE og Lu-177 er tilnærmet 7.68. Reaksjonsbufferen er 0.1M ammonium acetat og har pH på 5. Reaksjonen foregikk ved 80grader i 45minutter. Utbyttet til kompleksdannelsen er undersøkt ved hjelp av germanium detektor. Resultatene viser at det er mulig med kompleksutbytte > 98 % (Chakravarty, Das et al. 2010).



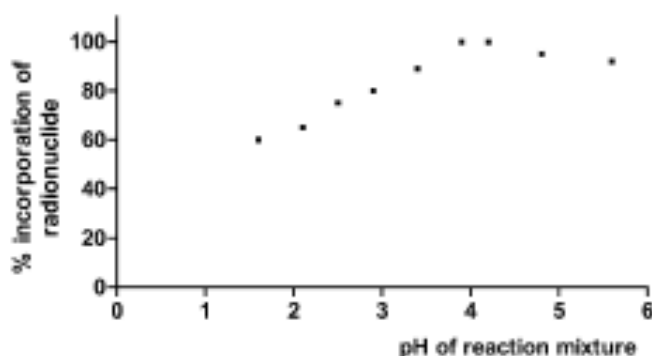
Figur 3.1: Stolpediagrammene viser aktivitetsfordelingen. Komplekset følger elueringsfronten, mens fritt Lu^{3+} -177 blir liggende på appliseringspunktet (Chakravarty, Das et al. 2010).

Papirkromatogrammet ble klippet i fire deler og gamma strålingen for hver av delene ble målt ved hjelp av Germaniumdetektor. Første del inneholder appliseringspunktet og toppen ved 208,8keV i gammaspekteret ble brukt til å identifisere Lu-177. Forsøkene har foregått både ved romtemperatur og ved ca.87 grader på oljebad. Det er tatt to paralleller for mesteparten av forsøkene.

En annen metode som ble benyttet er TLC med 0.1M Na_3sitrat (Wunderlich, Schiller et al. 2010, Lehenberger, Barkhausen et al. 2011). I denne metoden brukes tynne aluminiumplater med silika, det fungerer som den stasjonære fasen. Elueringsmiddelet er 0.1M Na_3sitrat med pH mellom 4-5. Det er gjort forsøk med Lu-177 og DOTATATE ved ulike forhold og 0.5M natriumacetat er brukt som reaksjonsbuffer. pH i reaksjonsblandingen var rundt 3-5. I denne metoden vil fritt Lu-177 følge elueringsmiddelet siden det bindes til sitrationet, mens komplekset blir liggende på appliseringspunktet. Germaniumdetektoren er brukt til å telle aktiviteten (Lehenberger, Barkhausen et al. 2011). Aluminiumplaten ble delt opp i nesten like store deler som med PC.

TLC med 1M ammoniumacetat og metanol (1:1 v/v) er også benyttet for noen av forsøkene for å sjekke om metoden fungerer. I denne metoden skal komplekset følge elueringsmiddelet, mens fritt ion blir liggende på appliseringspunktet (Decristoforo, Knopp et al. 2007).

Alle reaksjonsblandingene har pH-verdi mellom 4-5 siden der brukt i mange artikler. Man kan ikke ha alt for lavt eller høyt pH siden DOTATOC inneholder amidbindinger som kan brytes. I tillegg til det kan det bli dannet hydroksider av Lu^{3+} ($\text{Lu}(\text{OH})_3$). Det kan bidra til redusert løselighet og redusert mengde av Lu^{3+} som kan bindes til DOTATOC (Breeman, de Jong et al. 2003). Ved lav pH vil karboksylsyregruppene bli protonert slik at de mister ladningen, da vil bindingen til Lu^{3+} i komplekset bli svakere (Se figur 3.2).



Figur 3.2: Grafen viser at kompleksering med Lu^{3+} til DOTA-perptid foregår fullstendig ved pH 4-5, mens det reduseres raskt ved lav pH og gradvis ved høyere pH (Breeman, de Jong et al. 2003).

3.2.2 Beregning av kompleksutbytte og standardavvik for tellehastigheten

Radioaktiviteten til alle delene ble beregnet ved å dividere nettotelletall (NT) med telletiden (t) som ble angitt på skjermen. Kompleksutbytte for hver eluering er beregnet ved å summere tellehastigheten til alle delene og deretter beregne andelen de utgjør i forhold til summen av tellehastighetene. For enkelt målinger er standardavvik og relativ standardavvik for tellehastigheten beregnet ut i fra formler i artikkelen til Strom, 1998. For de fleste målingene er kun standardavviket beregnet og angitt i prosent ved å beregne andelen de utgjør i forhold til summen av tellehastighetene. Noen reaksjonsløsninger er analysert to ganger samtidig, differansen mellom de to analysene er også gitt i tabeller.

3.2.3 High Performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC er væskechromatografi der den mobile fasen (væske), presses gjennom en kolonne pakket med et material som retarderer stoffene. Separasjonsprinsippet ved bruk av HPLC kan være omvendt-fase-kromatogram. Da er den stasjonære fasen er lipofil, mens den mobile fasen er hydrofil. Komponenter blir retardert på den stasjonære fasen i ulik grad. Det er avhengig av deres løselighet/affinitet til den stasjonære fasen som tas i bruk. Når mobilfasen beveger seg gjennom den stasjonære fasen vil komponentene løse seg i mobilfasen og følge det hvis de er mer løselige i mobilfasen i forhold til den stasjonære fasen. Dette er en metode som benyttes for å skille komponenter i en løsning fra hverandre. Man kan bruke det for å identifisere stoffer, finne mengde av stoffene ut i fra intensiteten til signalene og detektere forurensninger. Metoden krever ikke store volumer av prøveløsningen og kan gi god separasjon av komponentene selv om de er veldig like i struktur. Komponentene blir detektert når de kommer ut av kolonnen med mobilfasen. Detektoren gir respons ved deteksjon av komponentene og det er proporsjonalt med konsentrasjon av stoffet i mobilfasen eller massen av komponentene i mobilfasen. Det gir dermed mulighet for kvantitative analyser basert på topphøyde eller toppareal til responsene. Det er mulig å ta i bruk ulike type detektorer, men det som er vanlig er UV-detektor. Det er en forutsetning at mobilfasen har lav UV-respons og det er dermed angitt UV-cutoff verdier for løsemidlene, for eksempel acetonitril har 190nm. Det betyr at man ikke kan bruke bølgelengder lavere enn dette siden absorpsjonen til acetonitril vil gi høy UV-respons (Bjergaard and Rasmussen 2004).

HPLC kan benyttes til å skille 177-Lu-DOTATOC komplekset fra fritt 177-Lu og DOTATOC. Separasjonsprinsippet bygger på ionparkromatografi, det benyttes for polare komponenter som ikke har så god retardasjon på stasjonærfasen (Bjergaard and Rasmussen 2004). C-18 kolonne er brukt som stasjonærfase og mobilfasen var acetonitril (ACN) og 10mM heptafluorbutyric (HFB) acid. Gradient eluering ble benyttet, det går ut på at sammensetningen til mobilfasen blir endret underveis. Det er vist i tabellene under. Elueringen ble startet med høyt innhold av HFB for at HFB og DOTATOC skal bindes sammen slik at retardasjonen til DOTATOC på stasjonærfasen øker. I begynnelsen ble ulike sammensetninger av mobilfasene og forskjellige kolonner prøvd ut for å finne en god metode som gir en klar og spiss topp for DOTATOC. Sammensetningen i tabell 3.1 ble prøvd ut med Accucore C18-kolonne, mens sammensetningen i tabell 3.2 ble prøvd ut med Gemini C18-kolonne. Hver prøve hadde en elueringstid på 12minutter og injeksjonsvolumet var 10µl.

Tabell 3.1: Mobilfase sammensetning.

Tid (min)	ACN (%)	10mM HFB syre (%)
Start	20 %	80 %
9 min	35 %	65 %
10 min	35 %	65 %
11 min	90 %	11 %

Tabell 3.2: Mobilfase sammensetning.

Tid (min)	ACN (%)	10mM HFB syre (%)
Start	20 %	80 %
9 min	35 %	65 %
10 min	35 %	65 %
11 min	90 %	10 %

3.2.4 Fast fase ekstraksjon (FFE)

Fast fase ekstraksjon kan brukes til å rense reaksjonsblandingen slik at mesteparten av fritt ion fjernes fra blanding (Zhernosekov, Filosofov et al. 2007). Dette er nyttig hvis man har stor mengde med fritt ion som overstiger den nedre grensen.

Man tar i bruk liten C18 kolonne (50mg, 1ml reservoar) som fungerer som den stasjonære fasen. Prinsippet for denne metoden er omvendt fase kromatografi, der den stasjonære fasen er lipofil på grunn av den lange hydrokarbonkjeden. Prosessen kan inndeles i fire trinn: kondisjonering, på setting, vasking og eluering. Man må klare å feste den ønskede komponenten på stasjonærfasen slik at man kan fjerne bort forurensninger/uønskede komponenter ved å eluere kolonnen med ulike løsningsmidler. Den ønskede komponenten må ikke være løselig i løsningsmidlene som brukes for å fjerne forurensninger i den påsatte prøven. For lipofil stasjonærfase skal man kondisjonere med metanol, det sørger for at C18 kjedene utvider seg slik at komponentene kan festes ved hjelp av lipofile interaksjoner (Bjergaard and Rasmussen 2004). En liten mengde av prøven settes på toppen av stasjonærfasen, man kan tilsette litt acetat slik at prøven kan presset inntil stasjonærfasen.

Man bør måle aktiviteten til acetatbuffer løsningen som presses gjennom kolonnen siden noe av aktiviteten kan følge med i den. Etter dette skal man vaske kolonnen med vann slik at forurensninger som er løselig i vann følger med vannet ut av stasjonærfasen. Eluering er det siste trinnet i prosessen, hvis alle forurensninger er blitt fjernet vil man kun ha komplekset i etanol. Man kan ikke bruke store volumer med etanol siden prøven blir fortynnet og man kan ikke injisere store mengder med etanol inntil kroppen. Det er vanlig å bruke 200-400 µl etanol og i sluttproduktet skal etanolemengden være < 5 % (Decristoforo, Knopp et al. 2007)

3.2.5 Væskescintillasjonstelling

Scintillasjonsdetektorer har et følsomt volum som sender ut lys ved ionisering. Det kan være uorganiske krystaller (NaI), organiske krystaller (antracen) og væsker (p-terfenyl i toluen). Krystallene må være gjennomsiktige slik at lys passerer gjennom (Lieser 2001).

Væskescintillasjonstelling er en rask metode for å detektere partikkel-stråling. Prøven er løst i en scintillatorvæske som gir høy telleeffektivitet (ofte nærmere 100 %) siden det er tett kontakt mellom radionukliden og scintillator molekylene. To fotomultiplikatorer måler lysmengden i scintillatoren som er proporsjonal med avsatt energi fra strålingen (Lieser 2001).

3.3 Forsøksoppsett

Oppgaven ble delt i to hoveddeler. I del 1 ble reaksjonskinetikken til Lu-177-DOTATOC komplekset undersøkt med ulike variabler. Kompleksdannelsen er undersøkt med temperatur, konsentrasjon og reaktantforhold som variable. I tillegg til det ble forskjellige elueringsmetoder undersøkt for å finne en god metode som skiller fritt Lu-177 fra Lu-177-DOTATOC komplekset. Elueringsmetodene ble undersøkt både for fritt 177-Lu og Lu-177-DOTATOC komplekset slik at det er mulig å sammenligne og bekrefte resultatene. Det ble også utført noen forsøk med Tb-160 og DOTATOC. I begynnelsen ble det gjort noen innledende forsøk for å finne egnede reaksjonsbetingelser.

I del 2 ble stabiliteten til Lu-177-DOTATOC komplekset undersøkt i 0,9 % NaCl løsning både med og uten 1mg/ml og 7mg/ml askorbatløsning.

I begynnelsen ble det utført noen forsøk for å finne informasjon om hvilke betingelser som egner seg for reaksjonen mellom Lu-177 og DOTATOC, deretter ble det utført mange forsøk for å sammenligne kompleksutbyttet ved ulike forhold mellom Lu-177 og DOTATOC. Alle reaksjonsløsningene ble lagd i eppendorf rør og merket ordentlig. LD betegnelsen er brukt for reaksjonsløsningene til Lu-177 og DOTATOC og TbD for reaksjonsløsningene til Tb-160 og DOTATOC. Aktive reaksjonsløsninger er nummerert med tall, mens kalde reaksjonsløsninger er merket med bokstaver. Parallellene reaksjonsløsninger er merket med et desimaltall i tillegg. Alle reaksjonsløsninger som er laget er lagt til som vedlegg nr.1 og nr.2.

HPLC (kap. 3.3.2) er utført for kald Lu^{3+} løsning, DOTATOC og noen kompleksreaksjoner med kald Lu^{3+} . FFE (kap. 3.2.3) er utført på TbD-3, 32 μM Tb^{3+} -160 i acetatbuffer, LD-10, LD-10.1 og 4mM Lu^{3+} løsningene, men kolonnen ble ikke kondisjonert med metanol før på setting av prøven for TbD-3, Tb^{3+} løsning og LD-10.

3.4 Stabilitetsstudie

Det er ikke mulig å injisere Lu-177- DOTATOC kompleksløsning i blodårene uten å ta hensyn til blodets tonisitet og pH-verdi. På grunn av det må man gjøre stabilitetsstudier der Lu-177-DOTATOC komplekset er i en isotonløsning. Stabilitetsstudiene er utført i 0,9 % NaCl og både med og uten 45mg/ml askorbatløsning siden 0,9 % NaCl er isotont med blodet og askorbat er en antioksidant som kan hindre oksidasjon av komponentene i formuleringen. Stabilitetsstudiene ble utført både ved romtemperatur og 45 °C. Utgangsløsningen for Lu-177-DOTATOC komplekset for begge studiene ble lagd hver for seg, mens utgangsløsningen for 45mg/ml askorbatløsning er den samme for begge. 45mg/ml askorbatløsning, 0,9 % NaCl og 0,2M NaAcetat ble filtret før de ble brukt i studiene slik at forurensninger/partikler i løsningene ikke påvirker elueringsmetoden. I begge studiene ble TLC med 0,1M $\text{Na}_3\text{sitratt}$ brukt som elueringsmetode og aktiviteten til platene ble telt i germaniumdetektoren. Kompleksutbyttet til begge utgangsløsningene for Lu-177-DOTATOC ble undersøkt slik at det kan brukes som referanse til studiene. Stabilitetsstudie ved romtemperatur foregikk i åtte dager og stabilitetsstudie ved 45 °C foregikk i fire dager.

3.4.1 Stabilitetsstudie ved romtemperatur (25 °C)

Det ble lagd to løsninger av Lu-177-DOTATOC komplekset i følge det som er nevnt nedenfor. 0,20M Naacetat ble blandet sammen med 1mg/ml DOTATOC først, deretter ble Lu-177 tilsatt og blandet godt sammen. Reaksjonsløsningene var i eppendorfrør og reaksjonene foregikk i 15min ved 88 °C. Begge reaksjonsløsningene ble blandet sammen og kalt løsning A (Lu-177-DOTATOC pH 4.8 og 900 MBq/ml, kalibrert 14.03.13, kl.12.00). Løsning A er brukt som utgangsløsning for Lu-177-DOTATOC komplekset for stabilitetsstudiene. 45mg/ml Askorbatløsning, pH:5 ble kalt løsning B.

40 µl (1 mg/ml) DOTATOC 185 µl 0.2 M NaAcetat (pH 4.8) og 250 MBq i 25 µl 177Lu (i 0,04 M HCl), totalt 250 µl.

Det ble lagd fire forsøk med tre paralleller for hvert av forsøkene. Disse forsøkene ble utført ved romtemperatur og hadde pH = 4.8. Forsøkene ble merket med tall, der det første tallet indikerer hvilket forsøk det er, mens det andre er for å skille parallellene, for forsøk 1 blir det da 1.1, 1.2 og 1.3. Sammensetningen til forsøkene er oppgitt nedenfor. Alle parallellene har 75µl som totalvolum og 459 µl av løsning A er brukt for å lage alle 12 prøvene.

Kalibreringsdato for aktiviteten til Lu-177 er 14.3, kl.12.00

Forsøk 1: 30 µl 0,9 % NaCl, 45 µl løsning A. Aktivitetskonsentrasjon 540 MBq/ml.

Forsøk 2: 28 µl 0,9 % NaCl, 2 µl løsning B, 45 µl løsning A. Aktivitetskonsentrasjon 540 MBq/ml og ascorbat 1 mg/ml

Forsøk 3: 18 µl 0,9 % NaCl, 12 µl løsning B, 45 µl løsning A. Aktivitetskonsentrasjon 540 MBq/ml og ascorbat 7 mg/ml

Forsøk 4: 66 µl 0,9 % NaCl 9 µl løsning A. Aktivitetskonsentrasjon 100 MBq/ml

3.4.2 Stabilitetsstudie ved 40 °C

Det ble lagd to forsøk (5 og 6) med tre paralleller for å undersøke stabiliteten ved 40 °C. Det ble lagd ny utgangsløsning for Lu-177-DOTATOC med sammensetningen som er skrevet under. Det fikk betegnelsen løsning A1.

40 µl (1 mg/ml) DOTATOC 168 µl 0.2 M NaAcetat (pH 4.8) og 250 MBq i 42 µl ¹⁷⁷Lu (i 0,04 M HCl), totalt 250 µl. Løsning A1

Forsøk 5: 32 µl 0,9 % NaCl, 38 µl løsning A1. Aktivitetskonsentrasjon 540 MBq/ml.

Forsøk 6: 21 µl 0,9 % NaCl, 11 µl løsning B, 38 µl løsning A1. Aktivitetskonsentrasjon 540 MBq/ml og ascorbat 7 mg/ml.

3.5 Oppsamling og måling av væskescintillasjonsprøver

Eluerte fraksjoner fra utløpet av HPLC-detektoren ble samlet manuelt før det gikk til avfall og aktiviteten til fraksjonene ble målt med væskescintillasjonstelling. Resultatene fra målingene ble brukt for å lage elueringsprofil som kan sammenlignes med elueringsplott basert på UV-deteksjon. Den ekstra tubingen som ble brukt for å samle opp fraksjonene vil forsinke radioaktivitestoppen for Lu-177-DOTATOC i forhold til UV-toppen fra HPLC systemet. HPLC systemet ble klargjort ved å kjøre kalde Lu-177-DOTATOC kompleksløsninger (LD-B og LD-C) først. Deretter ble eluerte fraksjoner samlet for løsning A, forsøk 3.2 og en blanding av forsøk 3.2 og LD-C (1:1 v/v). Aktivitetskonsentrasjonen til løsning A og forsøk 3.2 som ble brukt var 1MBq/ml. Det ble lagd standard for alle elueringene. Aktiviteten til fraksjonene ble dividert med aktiviteten til standarden for å lage elueringsprofil, der forholdet mellom fraksjonene og standarden er angitt på y-aksen og tid på x-aksen.

Væskescintillasjonsglass ble benyttet for å samle fraksjonene. Glassene ble veid ut på finvekt både før og etter samling av fraksjoner for å korrigere for unøyaktighet under fraksjonssamling. Fraksjonssamling ble startet like etter injeksjon av prøve i HPLC systemet, tidsintervallet ble 20sekunder mellom hvert glass. Det ble tjue glass for hvert eluering og telletiden i væskescintillasjon for et glass var ett min.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Del 1: Innledende forsøk

LD-1: 10µl 0.50mM DOTATOC + 20µl 4,27µM Lu-177, pH: 4-5

Tabell 4.1: Eluering av LD-1

	Første del	Andre del	Tredje del	Fjerde del
NT/t	2,2 cps	0,098 cps	0,070 cps	0,0 cps

I LD-1 er molforholdet (DOTATOC/ Lu-177) 58,5. Det forholdet er mye høyere enn det som er nevnt i artikkelen til (Chakravarty, Das et al. 2010). Reaksjonen ble utført ved romtemperatur og varte i 10 minutter siden det er høy mengde av DOTATOC i forhold til Lu-177. I tabell 4.1 er radioaktiviteten til delene angitt som NT/t (Nettotellettall/telletiden) og PC (kap. 3.2.1) av reaksjonsblandingen viser at det ikke har skjedd noe reaksjon. Dette påpeker at temperaturen kan være en viktig faktor for reaksjonen selv om det er mye av DOTATOC i forhold til Lu-177.

LD-2: 50µl 0,050mM DOTATOC + 50µl 4,27µM Lu-177, pH: 4-5

Tabell 4.2: Kompleksutbytte for LD-2

Reaksjonstid (min)	Kompleksutbytte (%)
7 min	75,2 %
50 min	85,6 %

Denne blandingen ble satt på oljebad ved 87 °C. Det ble utført PC etter 7min og 50min. Relativ standardavvik for tellingene er 1,6 % og 2.4 %. Usikkerheten i tellingene er dermed lavt. DOTATOC/ Lu-177 mol forhold er 11,7. Tabell 4.2 viser at kompleksutbyttet ble tilnærmet 75.2 % for reaksjonen som foregikk i 7 minutter, mens det ble over 80 % for reaksjonen som foregikk i 50 minutter. Her ble meste av komplekset værende igjen i den tredje delen og kun en liten del fulgte elueringsmiddelet til den fjerde delen. Selv om det er høyt utbytte her, er det ikke i nærheten av det som er oppgitt i artikkelen til (Chakravarty, Das

et al. 2010). Det oppsto dermed mistanke om at det var noe feil med analysemetoden. For å avdekke dette ble det lagd flere reaksjonsblandinger.

LD-3: 30µl 0,50mM DOTATOC + 30µl 42,7µM Lu-177, pH: 4-5

LD-3 har samme molforhold for komponentene som LD-2, men høyere konsentrasjon av begge stoffene. LD-3 sto først ved romtemperatur i et kvarter og ble satt på oljebad(87 °C) etter det. Metoden som er blitt benyttet til å undersøke resultatene er PC med 50 % acetonitril i vann som elueringsmiddel.

Tabell 4.3: Eluering av LD-3

Andel av applisert (%) ± Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del	Fjerde del
LD-3, 25 °C i 15min	73,1 % ± 0,86 %	4,9 % ± 0,096 %	2,9 % ± 0,12 %	19,1 % ± 0,27 %
LD-3, 87 °C 1,40h	1,8 % ± 0,13 %	13,2 % ± 0,27 %	12,8 % ± 0,22 %	72,2 % ± 0,58 %
LD-3, 87 °C 1,40h, nr.2	9,0 % ± 0,41 %	9,7 % ± 0,48 %	21,4 % ± 0,60 %	59,8 % ± 0,74 %

Resultatene til LD-3 (se tabell 4.3) viser at kompleksdannelse foregår både ved romtemperatur og 87 °C. Tabell 4.3 viser at resultatene ikke stemmer helt med prinsippet til elueringsmetoden. Separasjonen mellom fritt Lu³⁺-177 og Lu-177-DOTATOC komplekset er ikke god nok. Usikkerheten for alle tre elueringene er lave. Andre eluering av LD-3 ble utført to uker etter den første elueringen, det kan kanskje være årsaken til at det er lavere kompleksutbytte (fjerde del). Det er ikke mulig å bekrefte det, siden det er mistanke om elueringsmetoden fungerer optimalt. Utbyttet for Lu-177-DOTATOC komplekset er heller ikke like høyt som i artikkelen til (Chakravarty, Das et al. 2010). For å avdekke mistanken om det er noe feil med elueringsmetoden, ble det lagd tre paralleller for LD-3: LD-3.1, LD-3.2 og LD-3.3. Alle tre ble satt på oljebad (87 °C) i 45 minutter, mens reaksjonstiden for LD-3 var 84 minutter.

Tabell 4.4: Eluering av LD-3.1, LD-3.2 og LD-3.3

Andel av applisert (%) ± Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del	Fjerde del
LD-3.1	34,6 % ± 0,70 %	17,1 % ± 0,69 %	10,2 % ± 0,57 %	38,0 % ± 0,91 %
LD-3.2	19,2 % ± 0,71 %	23,4 % ± 0,76 %	22,4 % ± 0,75 %	35,1 % ± 0,86 %
LD-3.3	15,6 % ± 1,4 %	27,9 % ± 1,0 %	24,3 % ± 1,4 %	32,2 % ± 1,5 %

Tabell 4.4 viser andel av applisert mengde for alle delene til LD-3.1, LD-3.2 og LD-3.3.

Kompleksutbyttet (fjerde del) for alle reaksjonene ble for lave og aktivitet er detektert på alle delene. Usikkerheten for målingene er lave og analysemetoden fungerer dermed ikke optimalt.

Resultatene fra alle tre prøvene i tabellen 4.4 viser at det har skjedd reaksjon, men det er fortsatt en del Lu-177 som er igjen på appliseringspunktet. Det viser at all mengden av Lu-177 ikke er bundet til DOTATOC. I følge artikkelen til Chakravarty R. et al, (2009) skal man ha 98 % utbytte. Det har ikke blitt oppnådd i disse forsøkene selv om molforholdet mellom DOTATOC og Lu-177 er mye høyere enn det som er blitt brukt under forsøket i artikkelen. På grunn av en del vanskeligheter med PC ble det forsøkt med TLC-kromatogram for LD-3 og LD-3.2.

Tabell 4.5: Eluering av LD-3 og LD-3.2

Andel av applisert (%) ± Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del
LD-3	98,2 % ± 1,9 %	0,94 % ± 0,53 %	0,83 % ± 0,39 %
LD-3.2	99,1 % ± 1,9 %	0,86 % ± 0,50 %	IMA

*IMA: Ikke målbart aktivitet

LD-3 og LD-3.2 ble eluert på TLC-plate med 50 % ACN i vann. TLC-platen for begge løsningene ble delt i tre like store deler. Tabell 4.5 viser at mesteparten av applisert aktivitet er liggende på appliseringspunktet (første del). For andre og tredje delen ble aktiviteten svært lite for LD-3, mens det ikke var mulig å detektere noe for tredje delen til LD-3.2. Det er også mulig å se det fra usikkerheten til disse delene, det er for høyt. Det ble ikke noe gode telletall for disse selv om det ble telt i 9-14 minutter. Resultatene i tabell 4.3, 4.4 og 4.5 kan dermed

brukes for å vise at 50 % ACN i vann ikke er egnet til å separere fritt Lu-177 og Lu-177-DOTATOC på PC og TLC.

0,1M Natriumsitrat(pH: 4-5) er blitt brukt som mobilfase for TLC i noen artikler, for eksempel (Lehenberger, Barkhausen et al. 2011). I denne artikkelen står det ikke noe om komplekset vil følge elueringsfronten eller bli liggende på appliseringspunktet. Det ble dermed antatt at komplekset vil følge elueringsfronten. I følge dette prinsippet skal aktiviteten være høy for elueringsfronten, men det ble ikke slik i de forsøkene som ble gjort senere. Det ble mer aktivitet på appliseringspunktet i forhold til de andre plate-delene. Etter en del undersøkelser ble det funnet i andre artiklene at komplekset ikke følger elueringsfronten, for eksempel (Wunderlich, schiller et al. 2010). I denne artikkelen står det at fritt Lu-177 ioner binder seg til sitrationer og følger elueringsmiddelet. 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5) ble prøvd ut for LD-3.3 både på PC og TLC. Resultatene er oppgitt i tabell 4.6. Det ble mindre av komplekset ved analysering med PC, mye av aktiviteten er detektert på den andre delen og usikkerheten for målingene er for høye. Alle delene ble delt i over 20 minutter, det ble allikevel lave telletall. Det kan være på grunn av at det er satt på lite volum for eluering. Det er detektert mer aktivitet på appliseringspunktet til TLC-platen, ingen aktivitet for andre delen og litt på den tredje delen. Analysering med TLC viser at det er mer komplekset tilstede og det er bedre egnet til å separere fritt Lu³⁺-177 og Lu-177-DOTATOC. Usikkerheten for disse målingene er også for høye.

Tabell 4.6: Eluering av LD-3.3 både på PC og TLC med 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5)

Andel av applisert (%) ± Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del
LD-3.3, PC	29 % ± 8,0 %	59,8 % ± 7,8 %	11,2 % ± 4,8 %
LD-3.3, TLC	87,9 % ± 6,5 %	IMA	12,1 % ± 4,5 %

*Ikke målbar aktivitet

Det ble lagd flere reaksjonsløsninger og resultatene er angitt i tabell 4.7. Alle reaksjonsløsningene ble satt på oljebad(87 °C) i 45minutter. I LD-4 er molforholdet (DOTATOC/Lu-177) 33, mens det er tilnærmet 17 i LD-5 og LD-6.

LD-4: 20µl 0,50mM DOTA-TOC + 20µl 15,1µM 177-Lu + 10µl 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-5: 20µl 0,25mM DOTA-TOC + 20µl 15,1µM 177-Lu + 10µl 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

**LD-6: 20µl 0,50mM DOTA-TOC + 29,57µM 20µl 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃,
pH: 4-5**

LD-4 ble analysert med tre forskjellige metoder. Tabell 4.7 viser at kompleksutbyttet er forskjellig for alle dem. Kompleksutbyttet er høyest for TLC med 0,1M natriumsitrat. LD-4.1 er parallell til LD-4 og det er blitt eluert to ganger med PC og 50 % ACN i vann. Begge elueringene har nesten like verdier for kompleksutbyttet, men det er ikke like høyt som det var for LD-4 ved eluering med TLC og 0,1M natriumsitrat. LD-5 har høyest kompleksutbytte for TLC med 0,1M natriumsitrat. Differansen(52,9 %) mellom kompleksutbytte for begge analysemetodene er for store. Usikkerheten for resultatene til LD-4, LD-4.1 og LD-5 er altfor høye. Det kan være på grunn av lite telle tid og redusert volum ved applisering. Fra tidligere forsøk (tabell 4.3 og tabell 4.4) har det blitt påvist at PC med 50 % ACN i vann ikke fungerer optimalt. Det ble dermed ikke lagd noen flere reaksjonsløsninger for å analysere med PC og 50 % ACN i vann.

Det ble tatt to kromatogram for LD-6. Første delen(appliseringspunktet) for begge TLC-platene hadde to topper som identifiserer Lu-177. Det kom ved 113,3keV og 208,8keV. Resultatene for LD-6 er tilnærmet 100 %. LD-6 ble laget og undersøkt for å verifisere resultatene i tabell 4.7. Resultatene til LD-6 har ikke høy usikkerhet og det viser at TLC med 0,1M natriumsitrat fungerer bra for å separere mellom fritt Lu³⁺-177 og Lu-177-DOTATOC komplekset.

Tabell 4.7: Eluering av LD-4, LD-4.1, LD-5 og LD-6.

Reaksjonsblanding	Elueringsmetode	Kompleksutbytte (%) ± Andel av standardavvik (%)
LD-4	PC med 50 % ACN i vann	25,7 % ± 5,0 %
LD-4	PC med 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5)	62,0 % ± 5,4 %
LD-4	TLC med 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5)	98,4 % ± 2,9 %
LD-4.1	PC med 50 % ACN i vann	
	1. eluering	42,9 % ± 6,7 %
	2. eluering	39,5 % ± 3,5 %
LD-5	PC med 50 % ACN i vann	42,5 % ± 10,2 %
	TLC med 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5)	95,4 % ± 16,4 %
LD-6	TLC med 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5)	
	1.eluering	99,6 % ± 0,80 %
	2.eluering	99,1 % ± 1,52 %

4.1.1 Analyse av Lu³⁺-177 løsning

15,1µM Lu-177 ble analysert på PC og TLC. Eluering av fritt Lu³⁺-177 ble utført både med 50 % ACN i vann og 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5). Resultatene for TLC med 50 % ACN i vann er ikke oppgitt siden NT ble for lavt og usikkerheten for målingene ble for høye.

15,1 µM Lu³⁺-177 løsning ble analysert en gang med PC og 50 % ACN i vann.

Tabell 4.8: Eluering med PC og 50 % ACN i vann

Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del
15,1 µM Lu ³⁺ -177	69,7 % ± 9,9 %	14,1 % ± 8,6 %	16,2 % ± 8,7 %

Tabell 4.8 viser at mesteparten av Lu³⁺-177 blir liggende på appliseringspunktet(første del), mens en del av applisert Lu³⁺-177 følger elueringsmiddelet. Det stemmer ikke med det som er skrevet i artikkelen til Chakravarty, Das et al.2010(kap 3.2.1). PC med 50 % ACN i vann er

dermed ikke egnet til å separere fritt Lu^{3+} -177 og Lu-177-DOTATOC siden en del av fritt Lu^{3+} -177 vandrer sammen med Lu-177-DOTATOC komplekset. Resultatene i tabell 4.8 har høy usikkerhet. Det burde ha vært eluert flere ganger for å redusere usikkerheten. Det er allikevel mulig å bekrefte at analysemetoden ikke fungerer ved hjelp av resultater fra tidligere forsøk (tabell 4.3 og 4.4) og ved å henvise til figur 3.1 (kap. 3.2.1) som viser at fritt Lu^{3+} -177 ikke vandrer med elueringsmidlet.

Tabell 4.9: Eluering av 250 μM og 1,1 μM Lu-177 med TLC og 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5)

Kompleksutbytte (%) \pm Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del	Fjerde del
Første eluering 250 μM Lu-177	1,0 % \pm 0,073 %	0,050 % \pm 0,047 %	0,71 % \pm 0,070 %	98,2 % \pm 1,0 %
Andre eluering 250 μM Lu-177	0,33 % \pm 0,084 %	0,091 % \pm 0,084 %	1,3 % \pm 0,093 %	98,2 % \pm 1,0 %
Kompleksutbytte (%) \pm Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del	Fjerde del
Første eluering 1,1 μM Lu-177	0,070 % \pm 0,023 %	0,022 % \pm 0,011 %	0,24 % \pm 0,022 %	99,7 % \pm 0,27 %
Andre eluering 1,1 μM Lu-177	0,10 % \pm 0,028 %	0,060 % \pm 0,024 %	0,82 % \pm 0,032 %	99,0 % \pm 0,35 %

Tabell 4.10: Eluering av 4mM Lu-177 løsning.

Kompleksutbytte (%) \pm Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del
Første eluering 4mM Lu-177	0,050 % \pm 0,0033 %	0,34 % \pm 0,0076 %	99,6 % \pm 0,21 %
Andre eluering 4mM Lu-177	0,16 % \pm 0,0038 %	0,27 % \pm 0,0058 %	99,6 % \pm 0,21 %

Lu-177 løsning med tre forskjellige konsentrasjoner ble analysert med TLC og 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5). TLC-platene til 4mM Lu-177 løsning med delt i tre deler. Tabell 4.9 og 4.10 viser at fritt Lu^{3+} -177 følger elueringsmiddelet nesten fullstendig. Det er svært lite deteksjon av aktivitet på appliseringspunktet(første del), andre delen og tredje delen (se tabell 4.9). Dette stemmer med artiklene til (Wunderlich, Schiller et al. 2010, Lehenberger,

Barkhausen et al. 2011). Tilnærmet 0,1 % av applisert Lu-177 løsning blir værende igjen på appliseringspunktet. Usikkerheten til nesten alle målingene er lave, bortsett fra andre delen til begge løsningene i tabell 4.9. De verdiene har høy usikkerhet selv om det ble delt i over 10 minutter. Det er dermed ikke noe merkbar aktivitet på de delene. TLC med 0,1M natriumsitrat er godt egnet til å separere fritt Lu-177 fra Lu-177-DOTATOC løsning.

4.1.2 Reaksjonskinetikk ved romtemperatur

Reaksjonskinetikken til Lu-177 og DOTATOC er undersøkt ved romtemperatur.

Reaksjonsblandingene som ble undersøkt er LD-7.1 og LD-8.1. Det ble utført to elueringer hver gang for å kunne redusere usikkerheten som kan være relatert til operatøren og for å undersøke om resultatene kan reproduseres.

Molforholdet (DOTATOC/Lu-177) i LD-7.1 er 2. I tabell 4.11 er kompleksutbytte til alle elueringene oppgitt med standardavvik. LD-7.1 er analysert fire ganger ved ulike tidspunkter. Usikkerheten til alle elueringene er lave, det påpeker at mesteparten av aktiviteten som detekteres kommer fra komplekset. I tabell 4.12 er kompleksutbyttet (gjennomsnitt av begge elueringene) oppgitt med differanse mellom elueringene. Differansen til alle analysene er lave, det påpeker at det ikke er store forskjeller mellom elueringene og resultatene kan reproduseres.

LD-7.1: 20µl 0,50mM DOTA-TOC + 20µl 0,25mM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

Tabell 4.11: Begge elueringene til LD-7.1 for alle målingene

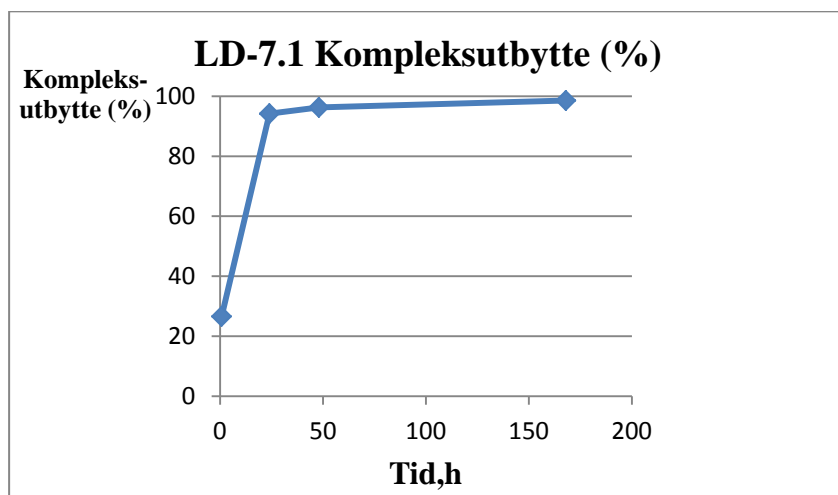
LD-7.1 Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
Tid, h		
0,75 h	27,1 % ± 0,50 %	26,1 % ± 0,50 %
24 h	93,8 % ± 1,0 %	94,3 % ± 1,0 %
48 h	96,7 % ± 1,1 %	95,7 % ± 1,0 %
168 h	97,7 % ± 0,90 %	99,4 % ± 0,65 %

Tabell 4.12: Kompleksutbytte til LD-7.1

Tid (h)	Kompleksutbytte (%)	Differanse (%)
----------------	----------------------------	-----------------------

0,75 h	26,6 %	1,0 %
24 h	94,1 %	0,50 %
48 h	96,2 %	1,0 %
168 h	98,6 %	1,7 %

Figur 4.1: Reaksjonskinetikken til LD-7.1 ved romtemperatur



Figur 4.1 er lagd fra verdiene i tabell 4.12. Grafen viser at kompleksdannelsen foregår med høyere hastighet de første 24 timene, deretter begynner det å flate ut. Kompleksdannelsen foregår saktere når det nærmer seg 100 % utbytte. Det forekommer siden dette er en likevektsreaksjon. Hvis det er høyt mengde av komplekset tilstede vil ikke drivkraften for kompleksdannelse være høy. Det er ikke beregnet noe uttrykk for grafen siden det er for få punkter.

Molforholdet (DOTATOC/Lu-177) i LD-8.1 er 16 og det er blitt analysert tre ganger. Resultatene er oppgitt i tabell 4.13 og 4.14. I tabell 4.13 er alle elueringene oppgitt med standardavvik. Usikkerheten til alle elueringene er lave. I tabell 4.14 er kompleksutbyttet (gjennomsnitt av begge elueringene) angitt med differanse mellom elueringene. Differansen er for høyt til analysen som er utført ved tiden 0,75 h. Begge elueringene har lav usikkerhet for deteksjon av radioaktivitet.

LD-8.1: 20µl 0,50mM DOTA-TOC TOC + 20µl 31,25µM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

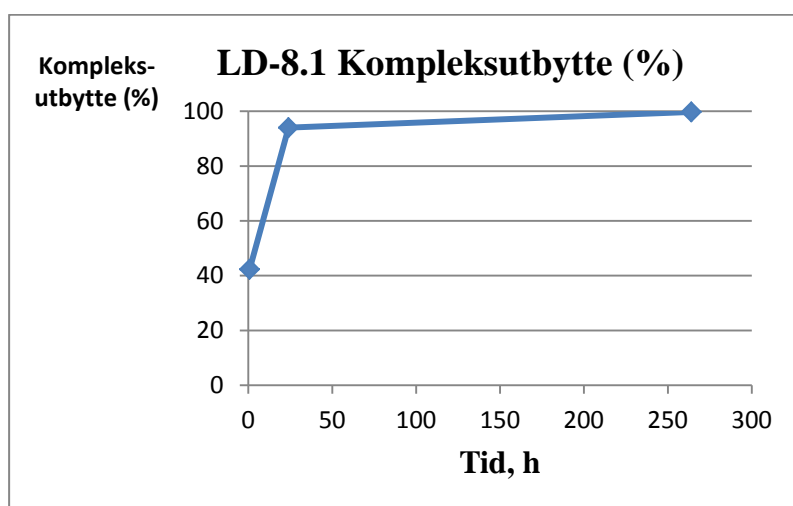
Tabell 4.13: Begge elueringene til LD-8.1 for alle målingene

LD-8.1 Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
Tid, h		
0,75 h	56,6 % ± 0,14 %	28,1 % ± 0,079 %
24 h	92,9 % ± 0,27 %	95,1 % ± 0,29 %
264 h	99,8 % ± 0,47 %	99,7 % ± 0,51 %

Tabell 4.14: Kompleksutbytte til LD-8.1

Tid (h)	Kompleksutbytte (%)	Differanse (%)
0,75 h	42,4 %	28,5 %
24 h	94,0 %	2,2 %
264 h	99,8 %	0,10 %

Figur 4.2: Reaksjonskinetikken til LD-8 ved romtemperatur



Figur 4.2 er lagd fra verdiene i tabell 4.14. Det ligner veldig mye på grafen til LD-7.1.

Kompleksdannelsen foregår raskere i begynnelsen og det begynner å flate ut når det nærmer seg 100 % utbytte.

Resultatene fra LD-7.1 og LD-8.1 viser at forholdet mellom utgangsstoffene påvirker reaksjonskinetikken. Man ser at det er økt kompleksutbytte for LD-8.1 etter 0,75 h enn for LD-7.1. Forholdet er 8 (16/2) ganger større for LD-8.1 enn LD-7.1, men det er ikke samme forhold for kompleksutbytte verdiene. Det er bare 1,59 (42,3/26,6) mer av kompleks i LD-8.1 i forhold til LD-7.1. Selv om det virker sånn i starten ser man at forskjellen utjevnes etter hvert i løpet av nesten lik tidsrom for begge. Det er dermed ikke så viktig med store forhold mellom utgangsstoffene for å få høyt utbytte, men ulempen er at det tar lang tid ved romtemperatur.

Hf-177 som dannes ved henfall av Lu-177 konkurrerer ikke med 177-Lu, siden resultater fra forsøkene viser ikke noe reduksjon av kompleksmengde selv etter halveringstiden til Lu-177. Det kan man se ut i fra resultatene til LD-7.1 etter 168h (7 dager) og LD-8.1 etter 264h (11 dager). Dette støttes opp av artikkelen til Wouter A.P.Breeman et al. 2003.

4.1.3 Reaksjonsblandinger med ulike molforhold mellom DOTATOC og Lu-177

Det ble lagd flere reaksjonsblandinger med forskjellige molforhold mellom DOTATOC og Lu-177. Kompleksutbytte til disse er oppgitt i tabell 4.15. Alle reaksjonsblandingene ble satt på oljebad (87 °C) i 45 minutter og analysert med TLC og 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5) to ganger. Resultater fra analysene er oppgitt i tabell 4.16. Usikkerheten til alle målingene er lave. Det ble høyere usikkerhet for den andre elueringen av LD-10 i forhold til den første elueringen. Det kan skyldes redusert telletid for den andre elueringen i forhold til den første elueringen.

I tabell 4.15 er usikkerheten angitt som differanse mellom begge elueringene, alle reaksjonsløsningene har lav differanse. Det påpeker at det ikke er store forskjeller mellom elueringene og resultatene kan reproduseres.

LD-7: 20µl 0,50mM DOTA-TOC + 20µl 0,25mM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-8: 20µl 0,50mM DOTA-TOC TOC + 20µl 31,25µM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-9: 20µl 0,50mM DOTA-TOC + 20µl 0,125mM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-10: 40µl 0,703mM DOTATOC (aq), 7,03µl 4mM Lu³⁺ (aq) + 10µl 50mM CH₃COOH +NH₃ , pH: 4-5

Tabell 4.15: Kompleksutbytte til LD-7, LD-8, LD-9 og LD-10.

Reaksjonsblanding:	DOTATOC/ Lu-177	Kompleksutbytte (%)	Differanse (%)
LD-7	2	99,7 %	0,52 %
LD-8	16	99,8 %	0,08 %
LD-9	4	99,6 %	0,62 %
LD-10	1	99,9 %	0,02 %

Tabell 4.16: Begge elueringene til LD-7, LD-8, LD-9 og LD-10.

Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
LD-7	99,4 % ± 1,0 %	99,9 % ± 1,1 %
LD-8	99,9 % ± 0,24 %	99,8 % ± 0,24 %
LD-9	99,3 % ± 0,40 %	99,9 % ± 0,29 %
LD-10	99,9 % ± 0,15 %	99,9 % ± 1,7 %

Disse forsøkene bekrefter at det er mulig å oppnå høy kompleksutbytte med lave mol forhold mellom DOTATOC og Lu-177 under de samme betingelsene som benyttes for reaksjoner med høye mol forhold. Dette er nyttig informasjon siden det reduserer forbruket av DOTATOC slik at det ikke er nødvendig med bearbeidelser etter kompleksdannelsen for å fjerne fritt DOTATOC. Det kan i tillegg bli lettere å holde den nedre grensen til DOTATOC, 50µg per pasientdose (Decristoforo, Knopp et al. 2007) som gjelder ved intravenøst injeksjon.

4.1.4 Analyse av Terbium (Tb)-160

53,5µM Tb-160 løsning ble analysert fire ganger med TLC og 0,1M Na₃sitrat (pH: 4-5). Det ble utført for å undersøke om det egner seg til å separere fritt Tb-160 fra Tb-160-DOTATOC komplekset. TLC-platene ble delt i tre deler, første del inneholder appliseringspunktet. I gammaspekteret ble toppen ved 298keV benyttet for å identifisere Tb-160. I tabell 4.17 er resultatene fra de to første analysene oppgitt. Meste parten av applisert Tb-160 løsning følger elueringsmidlet, mens det er svært lite deteksjon av aktivitet på appliseringspunktet (første del) og andre del. Usikkerheten for de målingene (første og andre del) er høye, det ble lave

talletall (NT) selv om delene ble delt i over 10 minutter. For alle fire analysene ble mesteparten av fritt Tb-160 detektert på elueringsfronten, de andre delene hadde ikke noe tellbar aktivitet. Gjennomsnittet av tredje del til alle analysene og standardavviket ble $99,8 \% \pm 0,093 \%$. Disse verdiene viser at mesteparten av Tb-160 følger elueringsmiddelet under alle analysene. Standardavviket er lavt, det viser at spredningen mellom målingene er lave. Resultatene kan reproduseres.

Tabell 4.17: Eluering av $53,5\mu\text{M}$ Tb-160 løsning.

Andel av applisert (%) \pm standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del
Første eluering $53,5\mu\text{M}$ Tb-160	$0,034 \% \pm 0,086 \%$	$0,11 \% \pm 0,089 \%$	$99,9 \% \pm 0,85 \%$
Andre eluering $53,5\mu\text{M}$ Tb-160	$0,31 \% \pm 0,17 \%$	$0,031 \% \pm 0,19 \%$	$99,7 \% \pm 1,4 \%$

4.1.5 Reaksjon mellom Tb-160 og DOTATOC

Reaksjonskinetikken til Tb-160 og DOTATOC er undersøkt både ved romtemperatur og 87°C . TLC med $0,1\text{M}$ natriumsitrat som elueringsmiddel ble brukt til å analysere reaksjonsblandingen, Tb-160-DOTATOC komplekset blir liggende på appliseringspunktet, mens fritt Tb-160 vandrer med elueringsmiddelet. Det ble lagd reaksjonsblandinger med ulike molforhold mellom DOTATOC og Tb-160. I TbD-1 er molforholdet (DOTATOC/Tb-160) 6. Reaksjonskinetikken til TbD-1 er undersøkt ved romtemperatur, mens parallellene til TbD-1 (TbD-1.1 og TbD-1.2) er undersøkt ved 87°C . TbD-1 er analysert flere ganger, resultatene er oppgitt i tabell 4.18 og 4.19. Usikkerheten til kompleksutbytte verdiene i tabell 4.18 er lavt og differansen mellom begge elueringene i tabell 4.19 er lave. Det viser at resultatene er troverdige siden både usikkerheten i tellemetoden og usikkerheten forbundet til operatøren er lavt. Figur 4.3 viser at kompleksdannelsen øker med tiden, det foregår med høy hastighet i begynnelsen og begynner å flate ut når det nærmere seg 100% utbytte. Dette er blitt vist for DOTATOC og Lu-177 tidligere (se figur 4.1 og 4.2). Det viser at reaksjonskinetikken for begge lantanoidene (Tb-160 og Lu-177) er like.

TbD-1: $20\mu\text{l}$ $53,5\mu\text{M}$ Tb-160 (aq) + $20\mu\text{l}$ $0,321\text{mM}$ DOTATOC i

50Mm CH_3COOH + NH_3 , pH: 4-5

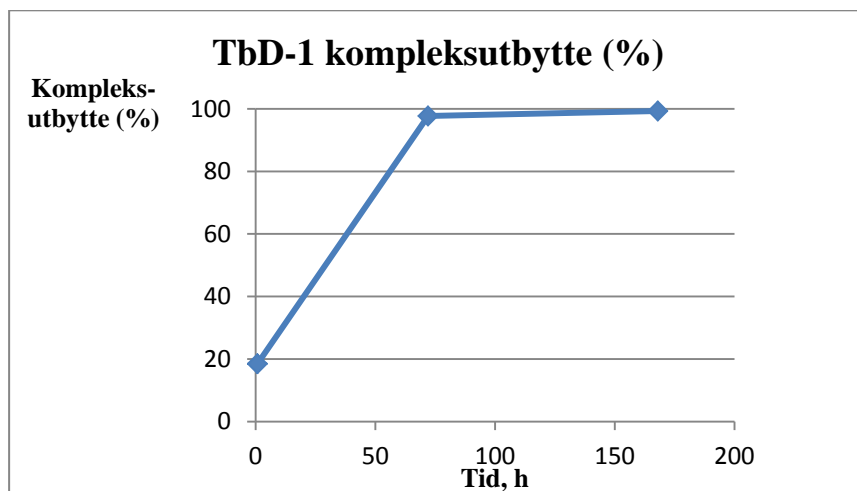
Tabell 4.18: Begge eluering av TbD-1.

TbD-1 Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
Tid, h		
0,75 h	18,4 % ± 0,69 %	18,6 % ± 0,63 %
72 h	97,8 % ± 0,92 %	97,6 % ± 1,4 %
168 h	99,2 % ± 0,96 %	99,3 % ± 1,0 %

Tabell 4.19: Kompleksutbytte til TbD-1.

	Tid, h	Kompleksutbytte (%)	Differanse (%)
TbD-1	0,75 h	18,5 %	0,20 %
	72 h	97,7 %	0,20 %
	168 h	99,3 %	0,10 %

Figur 4.3: Reaksjonskinetikken til TbD-1 ved romtemperatur.



I tabell 4.20 og 4.21 er resultatene til TbD-1.1 og TbD-1.2 oppgitt. Begge reaksjonsløsningene har stått ved 87 °C i 0,75 h (45 minutter). Det viser at reaksjonen mellom Tb-160 og DOTATOC foregår raskere ved høyere temperatur. Begge reaksjonsløsningene har høyt kompleksutbytte og er blitt analysert to ganger. I tabell 4.20

Tabell 4.20: Analyse av TbD-1.1 og TbD-1.2

Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
TbD-1.1	100 % ± 1,3 %	99,8 % ± 1,6 %
TbD-1.2	99,7 % ± 1,2 %	99,6 % ± 1,7 %

Tabell 4.21: Kompleksutbytte til TbD-1.1 og TbD-1.2.

Reaksjonsblanding	Temperatur	Tid, h	Kompleksutbytte (%)	Differanse (%)
TbD-1.1	87 °C	0,75 h	99,9 %	0,39 %
TbD-1.2	87 °C	0,75 h	99,7 %	0,11 %

I TbD-2 er molforholdet (DOTATOC/Tb-160) 12. Reaksjonskinetikken til TbD-2 er undersøkt ved romtemperatur, mens parallellene til TbD-2 (TbD-2.1 og TbD-2.2) er undersøkt ved 87 °C. Det er utført flere analyser av TbD-2 ved romtemperatur for å undersøke reaksjonsprosessen.

TbD-2: 20µl 53,5µM Tb-160 (aq) + 40µl 0,321mM DOTATOC i

50Mm CH₃COOH + NH₃, pH: 4-5

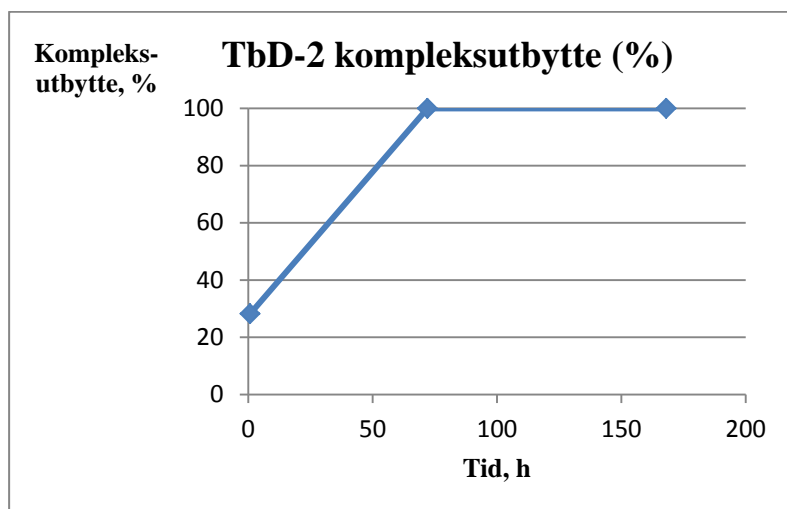
Tabell 4.22: Analyse av TbD-2.

TbD-2 Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
Tid, h		
0,75 h	28,4 % ± 0,61 %	28,1 % ± 0,49 %
72 h	99,9 % ± 1,6 %	100 % ± 1,4 %
168 h	100 % ± 1,2 %	100 % ± 1,5 %

Tabell 4.23: Kompleksutbytte til TbD-2.

	Tid, h	Kompleksutbytte (%)	Differanse (%)
TbD-2	0,75 h	28,2 %	0,32 %
	72 h	99,9 %	0,23 %
	168 h	100 %	0,38 %

Figur 4.4: Reaksjonskinetikken til TbD-2 ved romtemperatur.



TbD-2 har dobbelt så mye av DOTATOC i forhold til TbD-1 og ut i fra likevekts likning vet man at reaksjonen vil bli forskjøvet til høyre hvis det er mye av utgangsstoffene. Resultatene viser at TbD-2 har høyere kompleksutbytte enn TbD-1 etter at de har stått ved romtemperatur i 45 minutter (se figur 4.3 og 4.4). TbD-1 har 18.5 %, mens TbD-2 har 28.2 %. Det viser at forholdet mellom utgangsstoffene påvirker reaksjonskinetikken. De målingene som er tatt senere viser at forskjellen mellom begge utjevnes nesten fullstendig, begge nærmer seg 100 % kompleksutbytte i løpet av samme tid. Det er dermed kanskje ikke så viktig med høye molforhold (DOTATOC/Tb-160) for å oppnå høyt kompleksutbytte. Dette er også blitt funnet for DOTATOC og Lu-177.

I tabell 4.24 og 4.25 er resultatene til TbD-2.1 og TbD-2.2 oppgitt. Begge reaksjonsløsningene har stått ved 87 °C i 0,75 h (45 minutter). Disse forsøkene viser at reaksjonen er påvirket av temperatur. Standardavviket for kompleksutbytte verdiene i tabell 4.24 er litt høyt, det burde ha blitt delt litt lengre for å redusere usikkerheten i telletallet (NT). Differansen for begge analysene i tabell 4.25 er lavt, det viser at resultatene er reproducerbare.

Tabell 4.24: Analyse av TbD-2.1 og TbD-2.2.

Kompleksutbytte (%) ± Standardavvik (%)	Første eluering	Andre eluering
TbD-2.1	99,9 % ± 1,5 %	99,8 % ± 1,2 %
TbD-2.2	99,9 % ± 1,6 %	100 % ± 1,3 %

Tabell 4.25: Kompleksutbytte til TbD-2.1 og TbD-2.2.

	Tid, h	Kompleksutbytte(%)	Differanse(%)
TbD-2.1, 87 °C	0,75 h	100,0 %	0,19 %
TbD-2.2, 87 °C	0,75 h	99,9 %	0,07 %

4.1.6 TLC med 1,0M ammoniumacetat og metanol (1:1 v/v)

TLC med 1M ammoniumacetat og metanol (1:1 v/v) er brukt i artikkelen til (Decristoforo, Knopp et al. 2007) for å skille fritt Ga-68 fra Ga-68-peptider. I denne metoden skal komplekset følge elueringsmiddelet, mens fritt ion blir liggende på appliseringspunktet. Dette er prøvd ut på Lu-177 løsning, Tb-160 løsning, TbD-1,1 og LD-10.1. Det er utført to analyser for alle løsningene unntatt LD-10.1. Både TbD-1.1 og LD-10.1 har stått ved 87 °C i 45 minutter.

Tabell 4.26: Analyse av Lu-177 løsning, Tb-160 løsning, TbD-1,1 og LD-10.1.

Aktivitetsandelen (%) ± Standardavvik (%)	Første del	Andre del	Tredje del
4mM Lu-177			
Første eluering	99,8 % ± 0,12 %	0,088 % ± 0,0034 %	0,094 % ± 0,0037 %
Andre eluering	99,9 % ± 0,10 %	0,045 % ± 0,0034 %	0,077 % ± 0,0035 %
32 µM Tb-160			
Første eluering	99,9 % ± 1,4 %	0,075 % ± 0,14 %	IMA
Andre eluering	99,7 % ± 2,5 %	IMA	0,32 % ± 1,0 %
TbD-1.1			
Første eluering	3,6 % ± 0,80 %	96,4 % ± 2,5 %	IMA
Andre eluering	14,2 % ± 2,3 %	85,8 % ± 3,1 %	IMA
LD-10.1	8,8 % ± 0,058 %	91 % ± 0,32 %	0,20 % ± 0,014 %

*IMA: Ikke målbar aktivitet

Resultatene til Lu-177 og Tb-160 er oppgitt først i tabell 4.26, det viser at fritt ion blir liggende på appliseringspunktet (første del). Det er svært lite deteksjon av aktivitet på andre og tredje del. Begge analysene til Lu-177 ble veldig like, det oppstår nesten ikke noe vandring av fritt Lu-177 med elueringsmiddelet. Standardavviket for resultatene er lave og viser at det er lite usikkerhet i resultatene. Analyse av Tb-160 viser også at fritt ion blir liggende på appliseringspunktet. Standardavviket for første del til disse analysene er litt høye, for andre og

tredje del ble det ikke noe god deteksjon av aktivitet selv om det ble telt i 12-15 minutter. Det oppstår dermed ikke noe vandring av fritt Tb-160 med elueringsmiddelet.

Resultatene til TbD-1.1 og LD-10.1 viser at komplekset vandrer med elueringsmiddelet, men det stopper opp på andre del. I tillegg til det kan man se at det ikke er en god metode siden TLC med 0.1M natriumsitrat (pH: 4-5) gir opptil 100 % kompleksutbytte for TbD-1.1 (se tabell 4.21), mens det er rundt 91 % (gjennomsnitt av kompleksutbytte til TbD-1.1) for denne metoden. Standardavviket til kompleksutbytte (andre del) for TbD-1.1 er litt høyt. Begge analysene har ikke like verdier for kompleksutbytte, differansen (10,6 %) mellom verdiene er høyt. Det burde ha vært analysert flere ganger for å redusere usikkerheten. Det er allikevel mulig å påpeke at metoden ikke er like optimal som TLC med 0,1M natriumsitrat (pH: 4-5) ved å se på resultatene til LD-10.1. Standardavviket for alle delene til LD-10.1 er lave. LD-10.1 er parallell til LD-10. For LD-10 ble det tilnærmet 100 % utbytte (se tabell 4.15). Begge har reagert under de samme betingelsene, utbytte for LD-10.1 burde også ha vært tilnærmet 100 %. Kompleksutbytte til LD-10.1 er også bestemt ved hjelp av FFE (se tabell 4.28), det gir 99,4 % for LD-10.1. Tabell 4.26 viser at det er bare 91 % kompleksutbytte for LD-10 og komplekset følger ikke elueringsmiddelet fullstendig. Det er dermed ikke en god metode for å skille fritt ion fra komplekset.

4.1.7 High Performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC (kap. 2.13.2) er utført for kald Lu^{3+} løsning, DOTATOC og noen kompleksreaksjoner med kald Lu^{3+} . Alle kromatogrammene er lagt til som vedlegg 3 – 8.

Det ble kjørt flere elueringer for DOTATOC (se vedlegg 3). Første ble mobilfase sammensetningen som er oppgitt i tabell 3.1(kap. 3.2.2) prøvd ut med Accucore C18-kolonne. Da ble retensjonstiden for DOTATOC tilnærmet 9,5 minutter, siden det er nærme slutten av elueringstiden ble sammensetningen i tabell 3.2 (kap. 3.2.2) prøvd ut med Gemini C18-kolonne. Retensjonstiden for DOTATOC ble da endret til cirka 7,2 minutter. Toppen til DOTATOC ble klar og spiss, det viser at retensjonen på kolonne er god og all mengden av DOTATOC som ble injisert kommer ut samtidig. UV-absorbansspekter for DOTATOC viser at det har absorbanse rundt 225nm og 280nm. Absorbanse ved 225nm er høyere i forhold til absorbanse ved 280nm. Den sistnevnte metoden ble benyttet for alle de andre elueringene.

To paralleller for 10mM Lu^{3+} ble analysert på HPLC, det ble topp for Lu^{3+} i området 1,3-1,5 minutter siden det har liten retensjon på kolonnen (se vedlegg 4). UV-absorbansen for Lu^{3+} har maksimal verdi ved ca.220nm.

Kald LD-A har stått ved romtemperatur i 24 timer (reaksjonstiden) og molforholdet (DOTATOC/Lu) er 1. Eluering av kald LD-A ble ikke vellykket siden utgangsløsningen av 10mM Lu^{3+} ble lagd i 10mM HFB syre som kan binde til seg Lu^{3+} slik at det ikke er noe fritt Lu^{3+} for kompleksdannelse med DOTATOC (se vedlegg 5). På det ene kromatogrammet ble det en bred topp ved 1 minutt, det kan være toppen for Lu^{3+} siden det har gitt absorbans ved 220nm. Det ble ikke ingen klar topp for DOTATOC. På det andre kromatogrammet ble det ingen topp.

LD-B har lik molforhold som LD-A og har stått ved romtemperatur i 24 timer (reaksjonstiden). Eluering av LD-B gir tre spisse topper og ut fra tidligere resultater kan man anta at den første tilhører fritt Lu^{3+} , den andre er for Lu-DOTATOC kompleks og den siste toppen tilhører fritt DOTATOC (se vedlegg 6). Man kan også bekrefte dette ved å se på kromatogram med deteksjon 280nm der fritt Lu^{3+} ikke har noe absorbans. UV-absorbsjonskurven viser at både DOTATOC og Lu-DOTATOC kompleks har samme UV-absorbans maksimum. Retensjonstiden for Lu-DOTATOC komplekset ble rundt fire minutter. Hvis man sammenligner begge kromatogrammene for LD-B ser man at toppene for Lu-DOTATOC og fritt DOTATOC kommer litt senere under andre eluering, mens det kommer litt før for den første elueringen. Siden det ikke er så store forskjeller på retensjonstidene kan man si at metoden er reproduserbar. LD-B ble også eluert tre dager etter at det har stått ved romtemperatur. Kromatogrammene fra disse elueringene viser at det er blitt dannet mer av Lu-DOTATOC komplekset. Toppen til komplekset er blitt større, mens toppen for både Lu^{3+} og DOTATOC er blitt mindre. Dette stemmer godt med reaksjonsmekanismen som er undersøkt tidligere, der man ser at reaksjonen mellom Lu^{3+} og DOTATOC foregår sakte ved romtemperatur.

LD-C er laget med molforholdet (DOTATOC/Lu) lik $\frac{1}{2}$ og har stått ved romtemperatur i 48 timer. Mengden av Lu^{3+} er dermed doblet i forhold til LD-A og LD-B. Det er ikke noe topp for DOTATOC, det vil si at all mengden av DOTATOC som er tilsatt har dannet kompleks med Lu^{3+} -ionet (se vedlegg 7).

LD-D har motsatt mol forhold i henhold til LD-C, det er dobbelt så mye av DOTATOC enn Lu^{3+} . LD-D har stått i 10 dager, all mengden av Lu^{3+} skal dermed ha vært reagert med DOTATOC slik at det ikke ble noe topp for Lu^{3+} (se vedlegg 8).

4.2 Fast fase ekstraksjon (FFE)

FFE (kap. 3.2.4) ble prøvd ut på TbD-3, Tb-160 løsning, LD-10.1 og Lu-177 løsning. TbD-3 og LD-10.1 har stått ved 87 °C i 45 minutter. Fast fase ekstraksjon kan brukes til å rense reaksjonsblandingen slik at mesteparten av fritt ion fjernes fra blanding.

TbD-3: 20µl 53,5µM Tb-160 (aq) i vann, 9,1µl 0,703mM DOTATOC (aq) + 50mM 10 µl $\text{CHCOOH} + \text{NH}_3$

Tabell 4.27: FFE av TbD-3 og Tb-160 løsning.

Aktivitetsandel (%) ± standardavvik (%):	Acetatbuffer ved påsetting	Acetatbuffer fra vasketrinnet	Etanol som er brukt i eluering
TbD-3	7,4 % ± 0,46 %	4,2 % ± 0,41 %	88,4 % ± 1,8 %
Tb-160	90,3 % ± 0,30 %	9,2 % ± 0,090 %	0,6 % ± 0,021 %

FFE av TbD-3 og Tb-160 er utført uten å kondisjonere kolonnen med metanol først.

Resultatene til TbD-3 i tabell 4.27 viser at mesteparten av komplekset festes til kolonnen og blir eluert med etanol til slutt etter rensing med acetat. Resultatene til Tb-160 løsning viser at mesteparten av Tb-160 ioner fjernes ved påsetting og vasking slik at en liten andel havner i etanol. Standardavviket for resultatene i tabellen er lavt, det reduserer usikkerheten.

Resultatene for LD-10 er ikke lagt frem her siden telletiden for de løsningen ble altfor lavt.

Det ble satt på for mye på kolonnen slik at aktiviteten ble veldig høy, da vil detektoren få høy døtid slik at usikkerheten i tellingene øker.

Tabell 4.28: FFE av LD-10.1 og Lu-177.

Aktivitetsandel (%) ± standardavvik (%)	Acetatbuffer ved påsetting	Acetatbuffer fra vasketrinnet	Etanol som er brukt i elueringen
LD-10.1	0,5 % ± 0,0077 %	0,09 % ± 0,0027 %	99,4 % ± 0,11 %
Lu-177	87 % ± 0,094 %	12,6 % ± 0,018 %	0,27 % ± 0,0029 %

For de to forsøkene i tabell 4.28 ble kolonnen kondisjonert med metanol først.

Kompleksutbyttet ble tilnærmet 91 % for LD-10.1 ved eluering på TLC med 1M

ammoniumacetat og metanol (1:1 v/v), mens det ble litt over 99,0 % med FFE. Resultatene viser at komplekset får festet seg godt til kolonnen og meste parten av komplekset elueres med etanol. Forsøkene viser at metoden fungerer bra hvis kolonnen kondisjoneres med metanol først slik at C18-kjedene strekker seg ut. Det er viktig for at Lu-177-DOTATOC/ Tb-DOTATOC komplekset skal festes til kolonnen. Hvis det ikke kondisjoneres med metanol først vil en del av komplekset forsvinne under påsetting og vasketrinnet. Det kan man se fra resultatene til TbD-3 i tabell 4.27. FFE av Lu-177 løsning viser at mesteparten av fritt ion forsvinner under påsetting og vasketrinnet. Det er riktig siden det ikke vil oppstå noe interaksjon med C18-kjedene i kolonnen og fritt Lu-177. Usikkerheten i resultatene i tabell 4.28 er lavt siden standardavviket for målingene er lavt.

4.3 Del 2: Stabilitetsstudie ved romtemperatur (25 °C)

Løsning A ble brukt som utgangsløsning for Lu-177-DOTATOC komplekset til forsøkene. Kompleksutbyttet i løsning A ble analysert to ganger. Gjennomsnittet av kompleksutbyttet ble 99,4 %. Kompleksandel verdiene til alle parallellene som tilhører hvert forsøk er lagt til som vedlegg 9.

I alle forsøkene ble stabiliteten til Lu-177-DOTATOC komplekset undersøkt i 0,9 % NaCl løsning. Aktivitetskonsentrasjonen til Lu-177-DOTATOC komplekset og konsentrasjonen til askorbatløsning ble brukt som variable i forsøkene. I forsøk 1 og 4 ble aktivitetskonsentrasjonen til Lu-177-DOTATOC brukt som variabel og askorbatløsning ble ikke tilsatt. I forsøk 1 er aktivitetskonsentrasjonen 540 MBq/ml og i forsøk 4 er det 100MBq/ml. I forsøk 2 og 3 ble konsentrasjonen til askorbatløsning brukt som variabel. For begge forsøkene er aktivitetskonsentrasjonen 540 MBq/ml. I forsøk 2 ble 1 mg/ml askorbatløsning benyttet, mens det var 7 mg/ml askorbatløsning i forsøk 3. Stabiliteten til komplekset ble undersøkt i åtte dager. Kompleksandel er beregnet som gjennomsnitt av alle parallellene. Spredningen mellom parallellene er angitt som standardavvik. Kompleksandel verdiene er oppgitt i tabell 4.29 og 4.30.

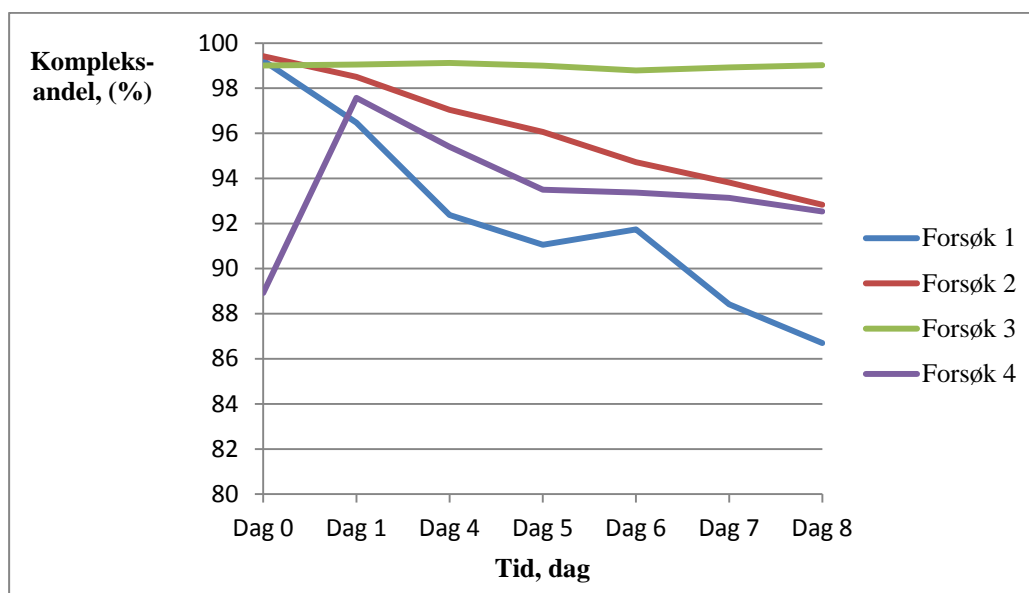
Tabell 4.29: Kompleksandel (%) til forsøkene, dag 0 – dag 5.

Kompleksandel (%): Gjennomsnitt ± standardavvik	Dag 0	Dag 1	Dag 4	Dag 5
Forsøk 1	99,3 % ± 0,3	96,5 % ± 1,5	92,4 % ± 2,7	91,1 % ± 1,9
Forsøk 2	99,4 % ± 0,1	98,5 % ± 0,3	97,0 % ± 2,0	96,1 % ± 3,1
Forsøk 3	99,0 % ± 0,5	99,0 % ± 0,2	99,1 % ± 0,1	99,0 % ± 0,1
Forsøk 4	88,9 % ± 9,6	97,6 % ± 0,2	95,4 % ± 0,2	93,5 % ± 0,2

Tabell 4.30: Kompleksandel (%) til forsøkene, dag 6 – dag 8.

Kompleksandel (%): Gjennomsnitt ± standardavvik	Dag 6	Dag 7	Dag 8
Forsøk 1	91,7 % ± 0,8	88,4 % ± 1,9	86,7 % ± 2,2
Forsøk 2	94,7 % ± 4,5	93,8 % ± 5,5	92,8 % ± 6,9
Forsøk 3	98,8 % ± 0,1	98,9 % ± 0,2	99,0 % ± 0,0
Forsøk 4	93,4 % ± 1,3	93,1 % ± 0,8	92,5 % ± 0,7

Figur 4.5: Kompleksandel (%) til forsøkene.



Figur 4.5 viser at forsøk nr.3 har god stabilitet i forsøksperioden på åtte dager uten signifikant reduksjon mengden Lu-177-DOTATOC. Det er høyest sannsynlig fordi det inneholder askorbat som er en antioksidant, det hindrer radikaler i å reagere med andre komponenter. Forsøk nr.3 har den høyeste askorbat konsentrasjonen og er dermed mest stabil.

Forsøk nr.2 har samme aktivitetskonsentrasjon som forsøk nr.3. Kompleksmengden i forsøk nr.2 reduseres raskere i forhold til forsøk nr.3 siden det har lavere konsentrasjon av askorbatløsning. Det viser at 1mg/ml askorbatløsning ikke er sterk nok til å hindre

oksidasjonsprosessen. For Forsøk 2 begynner standardavviket å øke etter dag 4, det viser at det begynner å bli større variasjon mellom parallellene. Det kan hende at mengden av radikaler som dannes i parallellene varierer slik at kompleksmengden reduseres med ulik hastighet.

Forsøk nr.1 og 4 har ikke noe askorbatløsning tilstede og grafen viser at kompleksandel reduseres mye raskere for disse prøvene. Siden forsøk nr.1 har høyere aktivitet enn forsøk nr. 4 reduseres kompleksmengden i forsøk nr.1 mye raskere.

Kompleksutbytte for forsøk nr.2 og forsøk nr.4 blir nesten likt etter åtte dager.

Ved dag 0 er kompleksandelen til forsøk nr.4 veldig lavt og man ser ut i fra tabellen at standardavviket er høyt. De andre dagene viser større kompleksandel og mindre usikkerhet i målingene. Ved dag 0 kan redusert kompleksandel være på grunn av at man har satt på for lite reaksjonsløsning på TLC-platen.

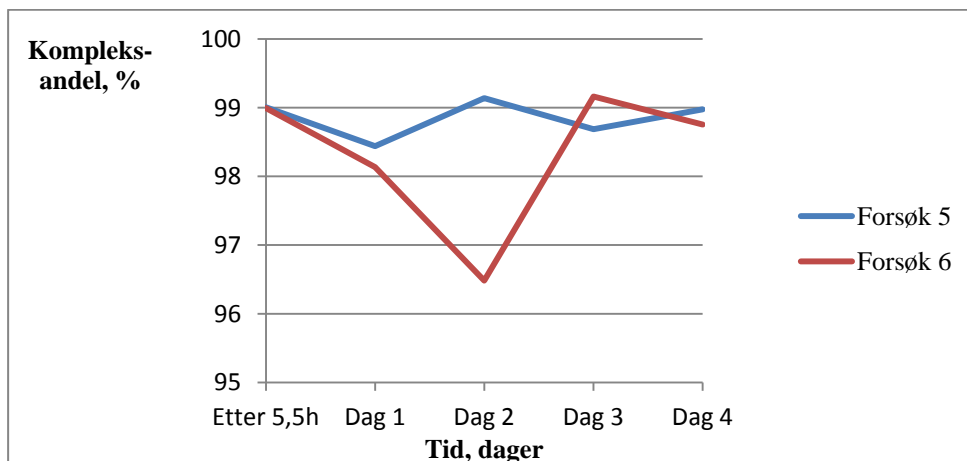
4.4 Stabilitetsstudie ved 40 °C

Forsøk 5 og 6 er utført ved 40 °C i varmeskap. Varmeskapet har ikke vært så lett å holde ved 40 °C. Det var rundt 45-50 °C. Prøvene ble satt i et annet varmeskap etter dag 2, der temperaturen var 45 °C. Det er lagd tre paralleller for forsøk 5, mens det ble bare to for forsøk 6 på grunn av søl. Usikkerheten til forsøk 6 er angitt som differanse mellom de to parallellene. Begge forsøkene har lik aktivitetskonsentrasjon (540 MBq/ml) for Lu-177-DOTATOC komplekset og 7 mg/ml askorbatløsning er tilsatt i forsøk 6. Det er ikke noe askorbatløsning i forsøk 5. Kompleksandel for alle parallellene er lagt til som vedlegg 10.

Tabell 4.31: Kompleksandel (%) for forsøk 5 og 6.

Kompleksandel (%): Gjennomsnitt ± Standardavvik/ differanse	Etter 5,5h	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4
Forsøk 5	99,0 % ± 0,0	98,4 % ± 0,2	99,1 % ± 0,3	98,7 % ± 0,8	99,0 % ± 0,0
Forsøk 6	99,0 % ± 0,3	98,1 % ± 1,5	96,5 % ± 3,1	99,2 % ± 0,2	98,8 % ± 0,4

Figur 4.6: Kompleksandel til Forsøk 5 og 6.



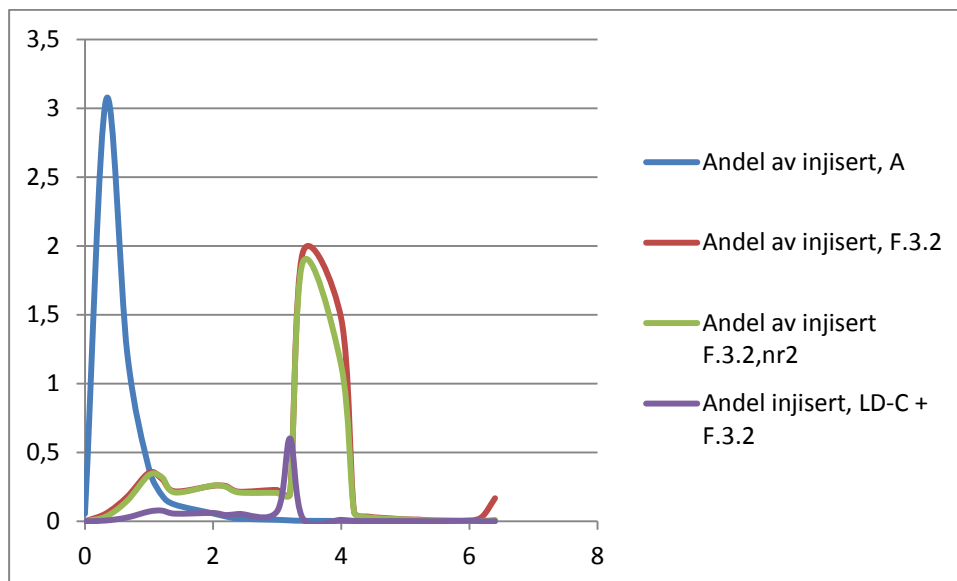
Ut fra tabell 4.31 kan man se at kompleksmengden for forsøk 5 ikke reduseres noe særlig selv om det ikke inneholder askorbatløsning. Standardavviket til resultatene er ikke så høye. Det påpeker at parallellene ikke har store forskjell i kompleksandel. Hvis man sammenligner forsøk 5 med forsøk 1 ser man at kompleksmengden reduseres raskere for forsøk 1 som var ved romtemperatur. Det er dermed høy sannsynlighet for at kompleksmengden reduseres for forsøk 5, siden temperaturen i varmeskapet ikke var så stabilt bør man gjenta disse forsøkene.

Forsøk 6 med askorbat holder seg ganske stabilt, det stemmer godt med det som er funnet for forsøk 3. På grunn av høy temperatur er det mer naturlig at kompleksmengden reduseres litt for forsøk 6, men det ser man ikke her. For dag 2 ble kompleksmengden til forsøk 6 lavt i forhold til de andre dagene. Siden kompleksmengden ikke er redusert for de neste dagene må det være noe feil med resultatene for dag 2.

Nevroendokrine tumorer kan behandles med Lu-177 merkede peptider. Pasientdose kan være i området 2,500 – 7,400 MBq (Kam, Teunissen et al. 2012).

4.5 Oppsamling og måling av væske scintillasjonsprøver

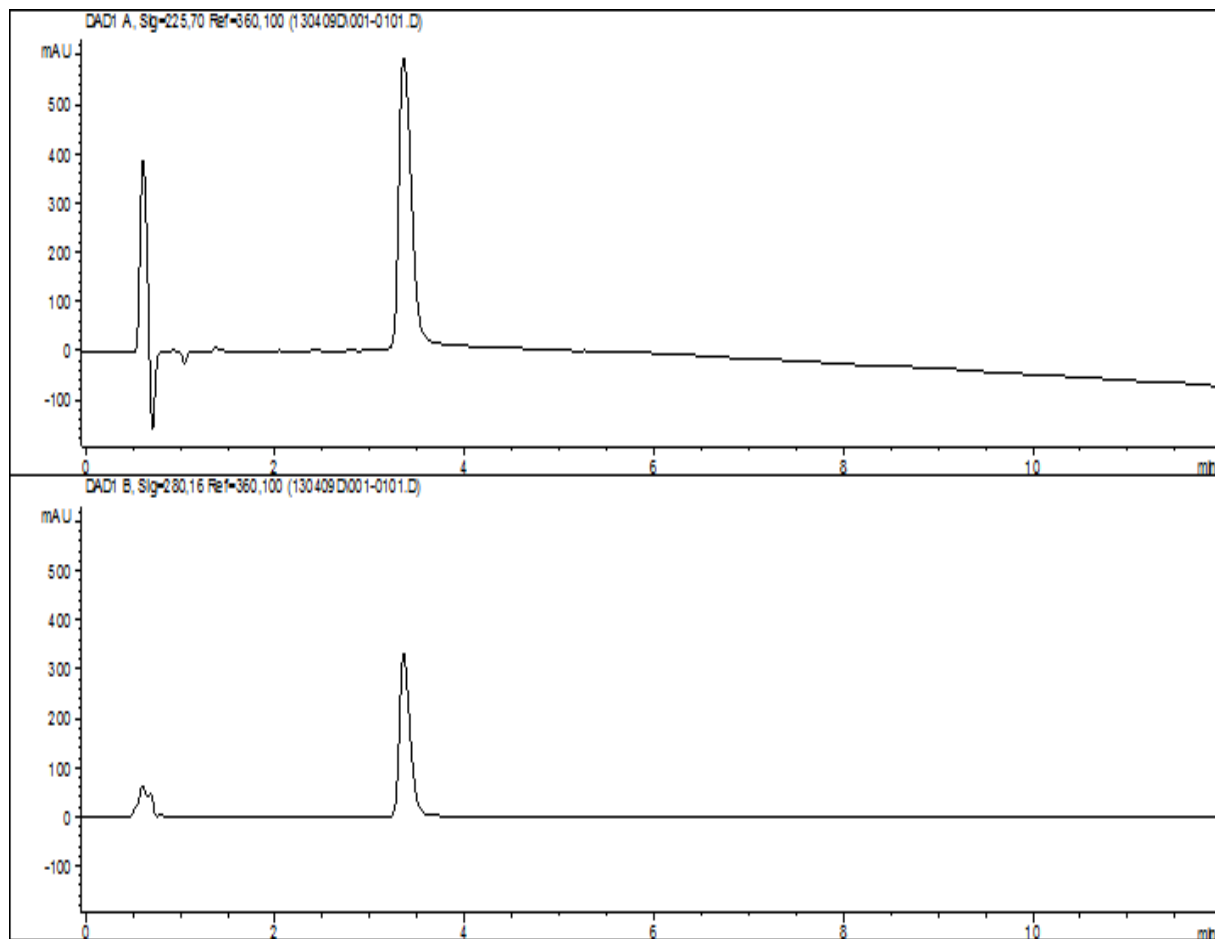
Figur 4.7: Elueringsprofil



Løsning A ble eluert, men det viser ikke noe topp for ^{177}Lu -DOTATOC her. Den første toppen kommer veldig tidlig og må være $^{177}\text{Lu}^{3+}$. For de andre løsningene ser man at det ikke er noe klar topp i starten som for løsning A. Det kan være på grunn av konkurransen med isosmørsyren som er en del av mobilfasen. pH i alle løsningene er 4-5, isosmørsyren vil være ladet og kan binde seg til $^{177}\text{Lu}^{3+}$ slik at det får økt retensjon. Forsøkene uten kald ^{177}Lu -DOTATOC har bred topp som kommer nærme 4 minutter, mens det kommer på 3.5 min når kald ^{177}Lu -DOTATOC er tilstede. Det er vanlig at bærerfri aktivitet kommer ut litt senere enn makroskopiske mengder, tubingen har dermed ikke bidratt til noe forsinkelse for den radioaktive toppen til ^{177}Lu -DOTATOC.

Kromatogram (figur 4.8) for løsning med kald kompleks viser at det kommer ut ved 3.5min.

Figur 4.8: Kromatogram for LD-C + F.3.2: Kromatogrammet viser toppen for fritt Lu-177 (den første) og DOTATOC komplekset (den andre).



5 Konklusjon

Kompleksdannelsen er undersøkt med temperatur, konsentrasjon og reaktantforhold som variable. Resultatene fra forsøkene viser at temperatur er viktig for reaksjonskinetikken, det blir økt kompleksdannelse ved høy temperatur. Reaksjonene som har foregått ved romtemperatur viser at reaksjonslikevekten til komplekset er forskjøvet i stor grad til høyre slik at kompleksmengden øker med tiden. Det er mulig å oppnå høy kompleksutbytte ved mol forholdet 1-2 mellom DOTATOC og Lu-177.

Forsøkene som er gjort med Tb-160 viser at det gir like gode resultater for kompleksdannelse. Begge lantanoidene (Lu-177 og Tb-160) har lik reaksjonskinetikk, resultatene viser at både temperatur og reaksjonstiden er viktige faktorer. Ved romtemperatur må reaksjonen foregå i mer enn syv døgn for å oppnå tilnærmet 100 % utbytte, mens det er mulig å oppnå full utbytte i løpet av 45 minutter hvis reaksjonene foregår ved 87 °C.

Av de tre metodene som er blitt benyttet til å undersøke kompleksutbytte er det TLC med 0.1M natriumsitrat (pH: 4-5) som fungerer bra. Fast fase ekstraksjon egner seg godt til å skille fritt DOTATOC fra komplekset ved gjeldende betingelser.

HPLC kan benyttes til å identifisere Lu^{3+} , DOTATOC og Lu-177-DOTATOC kompleks. Disse har ulik retensjonstid og UV-absorbans. DOTATOC og Lu-177-DOTATOC har samme UV-absorbans.

Stabilitetsstudie som er utført ved romtemperatur viser at Lu-177-DOTATOC komplekset kan være stabilt opptil åtte dager hvis det er askorbatløsning tilstede. Uten askorbat vil ikke komplekset være så stabil over lang tid i 0,9 % NaCl løsning. Resultatene fra stabilitetsstudie ved 40 °C er usikre, de forsøkene bør utføres på nytt.

6 Forslag til videre arbeid

Det må utføres flere stabilitetsstudier som foregår i minst to uker både ved romtemperatur og 40 °C. Man bør lage Lu-177-DOTATOC kompleks med høyere aktivitet og undersøke stabiliteten. Etter hvert bør man vurdere om det er mulig med stor skala produksjon.

7 Referanseliste

Audicio, P. F., G. Castellano, M. R. Tassano, M. E. Rezzano, M. Fernandez, E. Riva, A. Robles, P. Cabral, H. Balter and P. Oliver (2011). DOTA-anti-CD20: Labeling and pre-clinical studies." Applied Radiation and Isotopes **69**(7): 924-928.

Bjergaard, S. P. and K. E. Rasmussen (2004). Legemiddelanalyse, Fagbokforlaget.

Breeman, W. A. P., M. de Jong, T. J. Visser, J. L. Erion and E. P. Krenning (2003). "Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities." European journal of nuclear medicine and molecular imaging **30**(6): 917-920.

Chakravarty, R., T. Das, A. Dash and M. Venkatesh (2010). "An electro-amalgamation approach to isolate no-carrier-added Lu from neutron irradiated Yb for biomedical applications." Nuclear medicine and biology **37**(7): 811-820.

Cutler, C. S., C. J. Smith, G. J. Ehrhardt, T. T. Tyler, S. S. Jurisson and E. Deutsch (2000). "Current and potential therapeutic uses of lanthanide radioisotopes." Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals **15**(6): 531-545.

Decristoforo, C., R. Knopp, E. von Guggenberg, M. Rupprich, T. Dreger, A. Hess, I. Virgolini and R. Haubner (2007). "A fully automated synthesis for the preparation of ^{68}Ga -labelled peptides." Nuclear medicine communications **28**(11): 870-875.

Dvoráková, Z. (2007). "Production and chemical processing of ^{177}Lu for nuclear medicine at the Munich research reactor FRM-II."

Esser, J., E. Krenning, J. J. M. Teunissen, P. P. M. Kooij, A. L. H. van Gameren, W. Bakker and D. Kwekkeboom (2006). "Comparison of [^{177}Lu -DOTA 0, Tyr 3] octreotate and [^{177}Lu -DOTA 0, Tyr 3] octreotide: which peptide is preferable for PRRT?" European journal of nuclear medicine and molecular imaging **33**(11): 1346-1351.

Henriksen, T., F. Ingebretsen, A. Storruste, T. Strand, T. Svendbye and P. Wethe (1995). Stråling og helse, Fysisk institutt, Universitetet i Oslo, Norge.

Hofsli, E. (2002). "Somatostatinreseptorfamilien-et vindu mot ny kreftdiagnostikk og behandling." TIDSSKRIFT-NORSKE LAEGEFORENING **122**(5): 487-493.

Horwitz, E., D. McAlister, A. Bond, R. Barrans and J. Williamson (2005). "A process for the separation of Lu from neutron irradiated Yb targets." Applied radiation and isotopes **63**(1): 23-36.

J.Magill, G.Pfenning and J.Galy (2006). Karlsruher Nuklidekarte. Germany, Institute for Transuranium Elements.

Kam, B., J. Teunissen, E. Krenning, W. de Herder, S. Khan, E. van Vliet and D. Kwekkeboom (2012). "Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours." European journal of nuclear medicine and molecular imaging **39**(1): 103-112.

Lehenberger, S., C. Barkhausen, S. Cohrs, E. Fischer, J. Grünberg, A. Hohn, U. Köster, R. Schibli, A. Türler and K. Zhernosekov (2011). "The low-energy β and electron emitter ^{161}Tb as an alternative to ^{177}Lu for targeted radionuclide therapy." Nuclear medicine and biology **38**(6): 917-924.

Lieser, K. H. (2001). Nuclear and radiochemistry, Fundamentals and applications

Lovdata (2010). Forskrift om strålevern og bruk av stråling H.-o. omsorgsdepartementet, Folkehelseavdelingen, Statens strålevern, Østerås, Norge.

Oberg, K., U. Knigge, D. Kwekkeboom and A. Perren (2012). "Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Annals of oncology **23**(suppl 7): 124-130.

Oncolox. (2012). "Nevroendokrine svulster." Sett 30.04.13
<http://www.oncolox.no/no/Nevroendokrine>

Otte, A., E. Jermann, M. Behe, M. Goetze, H. Bucher, H. Roser, A. Heppeler, J. Mueller-Brand and H. Maecke (1997). "DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy." European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging **24**(7): 792-795.

Saha, G. B. (2010). Fundamentals of nuclear pharmacy, Springer. **sted, land**

Winfield, A. and R. Richards (2004). Sterile production areas. Pharmaceutical Practice 3th edition, Churchill Livingstone, UK 137-149.

Wunderlich, G., E. Schiller, R. Bergmann and H. J. Pietzsch (2010). "Comparison of the stability of Y-90-, Lu-177-and Ga-68-labeled human serum albumin microspheres (DOTA-HSAM)." Nuclear medicine and biology **37**(8): 861-867.

Zhernosekov, K. P., D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein and F. Rösch (2007). "Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application." Journal of Nuclear Medicine **48**(10): 1741-1748.

Zoller, F., M. Eisenhut, U. Haberkorn and W. Mier (2009). "Endoradiotherapy in cancer treatment—Basic concepts and future trends." European journal of pharmacology **625**(1): 55-62.

8 Vedlegg

VEDLEGG 1: Alle reaksjonsløsninger som er laget

Lu-177 og DOTATOC, alle løsningene har pH: 4-5:

LD-1: 10µl 0,50mM DOTATOC + 20µl 4,27µM 177-Lu, pH: 4-5

LD-2: 50µl 0,050mM DOTATOC + 50µl 4,27µM 177-Lu, pH: 4-5

LD-3: 30µl 0,50mM DOTATOC + 30µl 42,7µM 177-Lu, pH: 4-5

LD-4: 20µl 0,50mM DOTATOC + 20µl 15,08µM 177-Lu + 10µl 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-5: 20µl 0,25mM DOTATOC + 20µl 15,08µM 177-Lu + 10µl 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-6: 20µl 0,50mM DOTATOC + 20µl 29,57µM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-7: 20µl 0,50mM DOTATOC + 20µl 0,25mM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-8: 20µl 0,50mM DOTATOC TOC + 20µl 31,25µM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-9: 20µl 0,50mM DOTATOC + 20µl 0,125mM 177-Lu i 50mM CH₃COOH +NH₃, pH: 4-5

LD-10: 40µl 0,703mM DOTATOC (aq), 7,03µl 4mM Lu (aq) + 10µl 50mM DOTATOC, pH: 4-5

Tb-160 og DOTATOC, alle løsningene har pH: 4-5

TbD-1: 53,49µM 20µl Tb-160(aq) + 0,321mM 20µl DOTATOC i 50mM CH₃COOH + NH₃, pH: 4-5

TbD-2: 53,49µM 20µl Tb-160(aq) + 0,321mM 40µl DOTATOC i 50mM CH₃COOH + NH₃, pH: 4-5

TbD-3: 53,49µM 20µl Tb-160(aq), 0,703mM 9,13µl DOTATOC(aq) + 50mM 10 µl CH₃COOH + NH₃

Kalde reaksjoner:

LD-A: 300µl 0,250mM DOTATOC (aq) + 7,5 µl 10mM Lu³⁺, pH: 4

LD-B: 200µl 0.703mM DOTATOC (aq) + 14.1µl 10mM Lu³⁺, pH: 4

LD-C: 200µl 0.703mM DOTATOC (aq) + 28.2µl 10mM Lu³⁺, pH: 4

LD-D: 100µl 0.703mM DOTATOC (aq) + 10mM 3.53µl Lu³⁺, pH: 4

VEDLEGG 2: Tabeller listet med alle reaksjoner

Reaksjonsblanding	Mol forhold(DOTATOC/Lu-177)	Temperatur, °C	Reaksjonstid, h	Metode
Lutetium-177				
LD-1	58,5	25	0,17	PC
LD-2		87	0,12 og 0,83	PC
LD-3	11,7	25	0,25	PC,TLC
LD-3		87	1,67	PC
LD-3.1	11,7	87	0,75	PC
LD-3.2	11,7	87	0,75	PC, TLC
LD-3.3	11,7	87	0,75	PC, TLC
LD-4	33,2	87	0,75	PC, TLC
LD-4.1	33,2	87	0,75	PC
LD-5	16,6	87	0,75	PC, TLC
LD-6	16,9	87	0,75	TLC
LD-7	2	87	0,17	TLC
LD-7.1	2	25	0,75, 24, 48 og 168	TLC
LD-8	16	87	0,17	TLC
LD-8.1	16	25	0,75, 24 og 264	TLC
LD-9	4	87	0,17	TLC
LD-10	1	87	0,75	TLC, FFE
LD-10.1	1	87	0,75	TLC-2, FFE

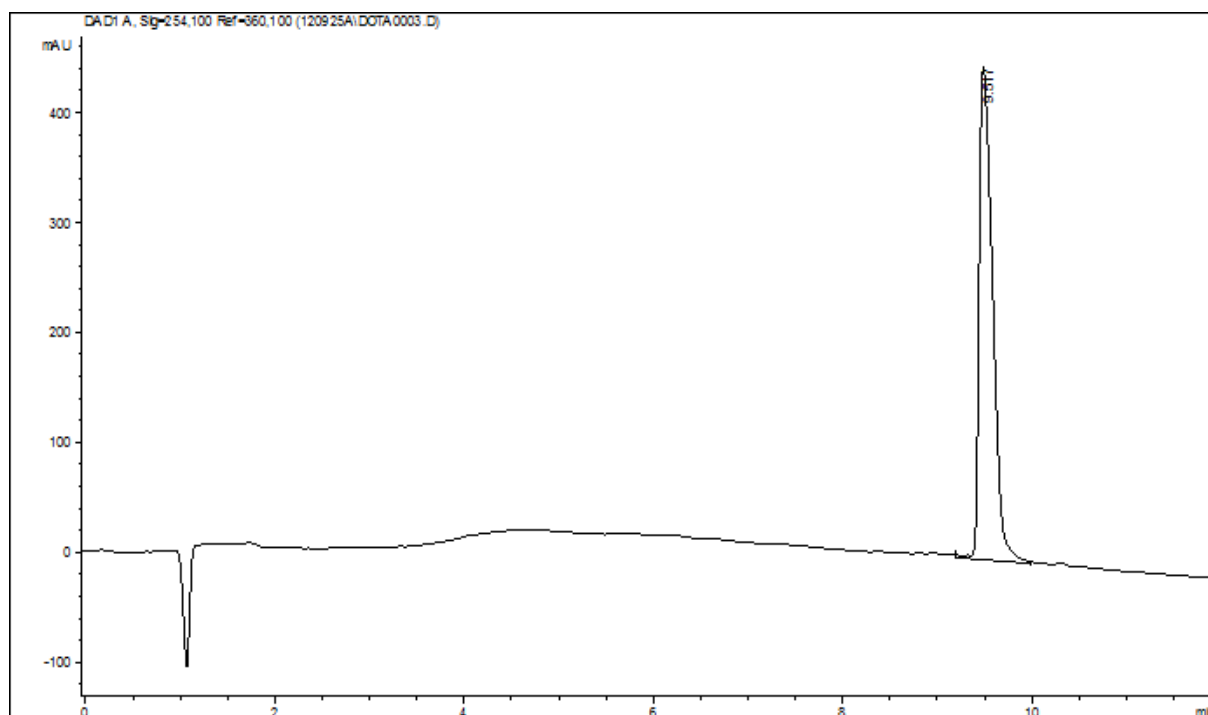
Reaksjonsblanding	Mol forhold(DOTATOC/Tb-160)	Temperatur, °C	Reaksjonstid, h	Metode
Terbium				
TbD-1	6	25	0,75, 72 og 168	TLC
TbD-1.1	6	87	0,75	TLC, TLC-2
TbD-1.2	6	87	0,75	TLC
TbD-2	12	25	0,75, 72 og 168	TLC
TbD-2	12	87	0,75	TLC
TbD-2.1	12	87	0,75	TLC
TbD-3	6	87	0,75	FFE

Kalde reaksjonsblandinger:

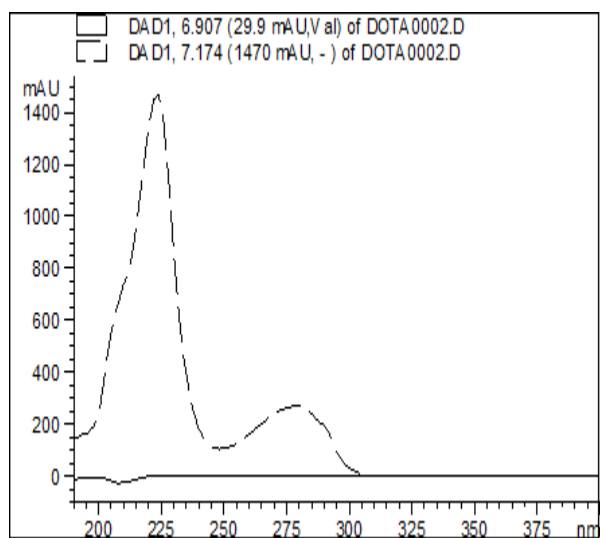
Reaksjonsblanding	Mol forhold(DOTATOC/Lu)	Temperatur, °C	Reaksjonstid, h	Metode
LD-A	1	25	24	HPLC
LD-B	1	25	24	HPLC
LD-C	0,5	25	48	HPLC
LD-D	2	25	240	HPLC

VEDLEGG 3: HPLC kromatogram for DOTATOC løsning.

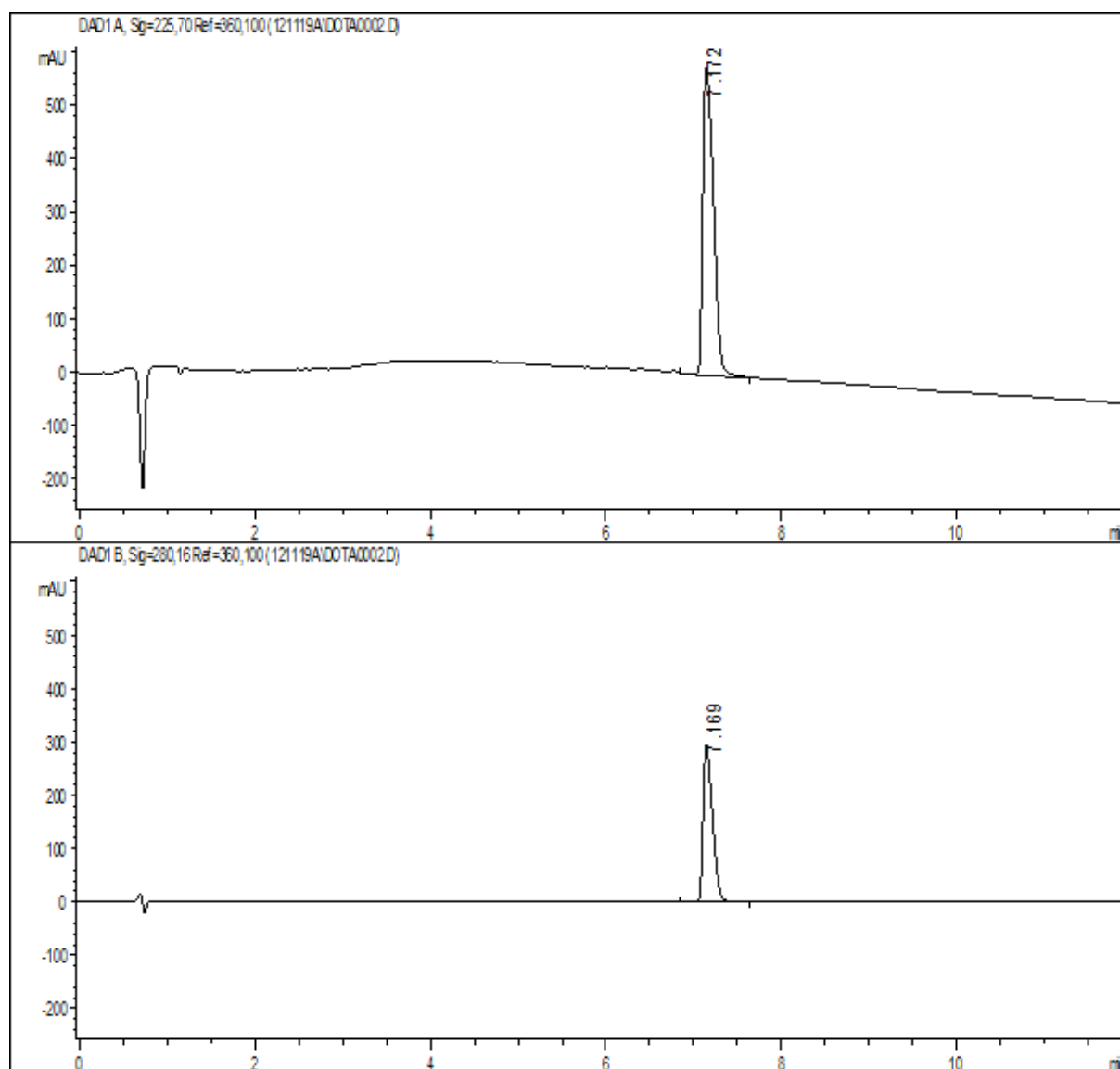
Kromatogram nr.1:



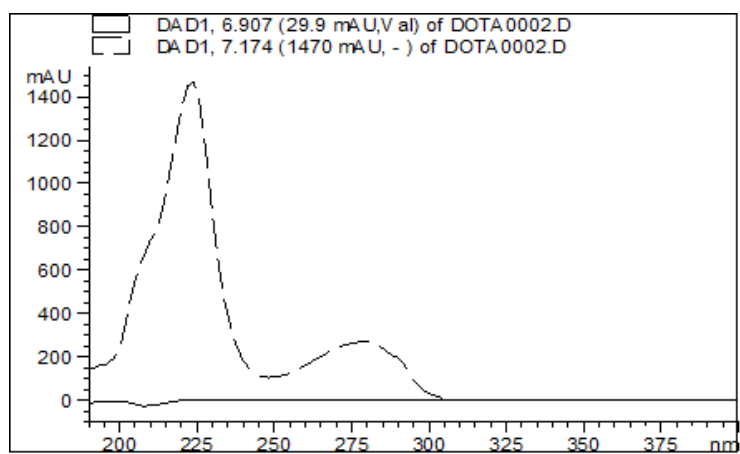
UV-absorbans:



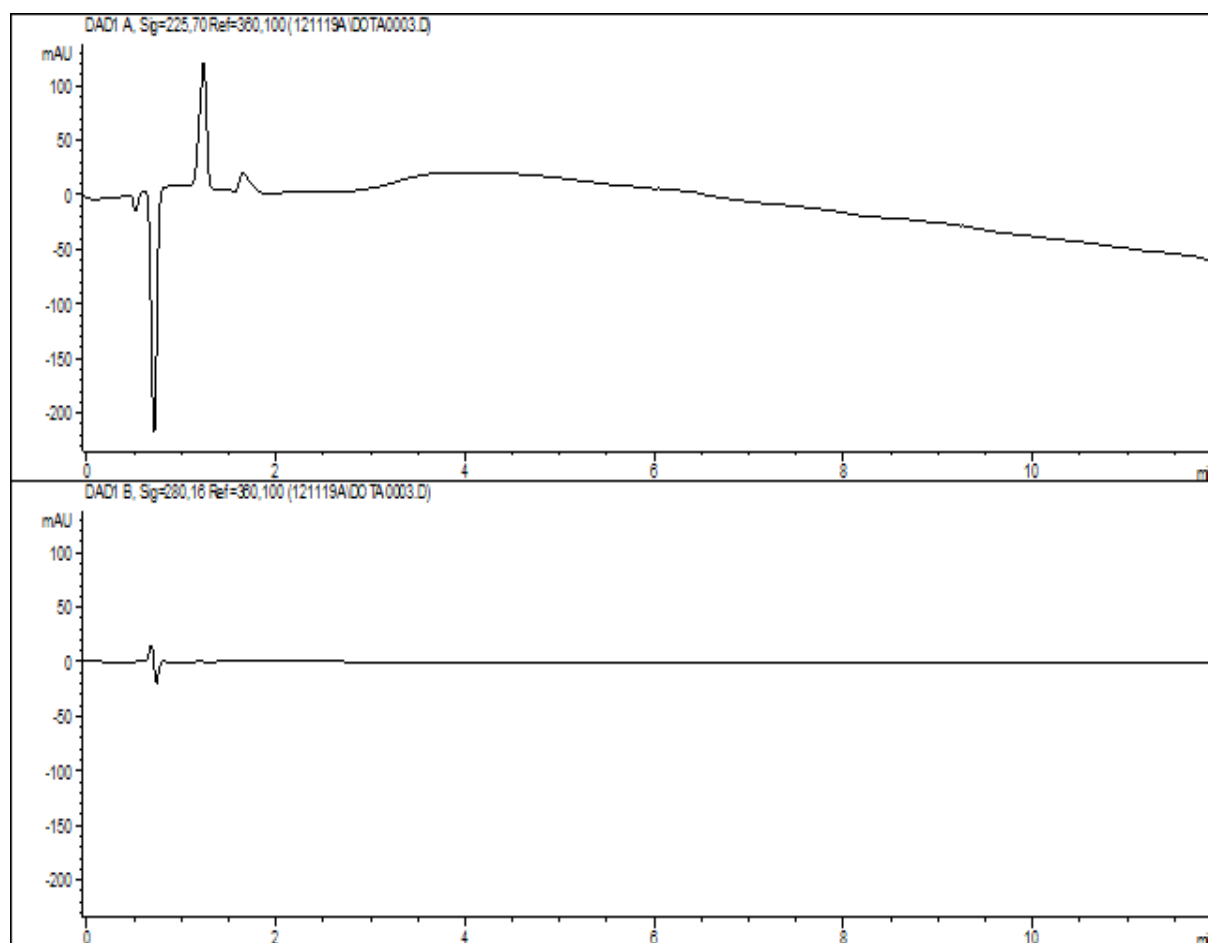
Kromatogram nr.2:



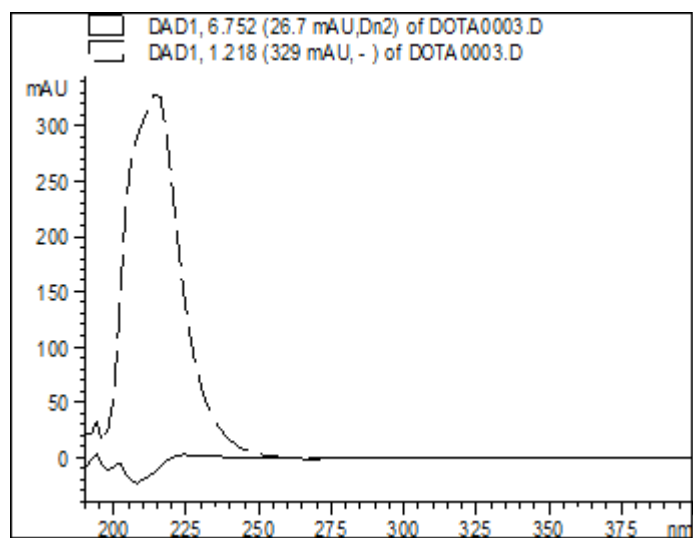
UV-absorbans:



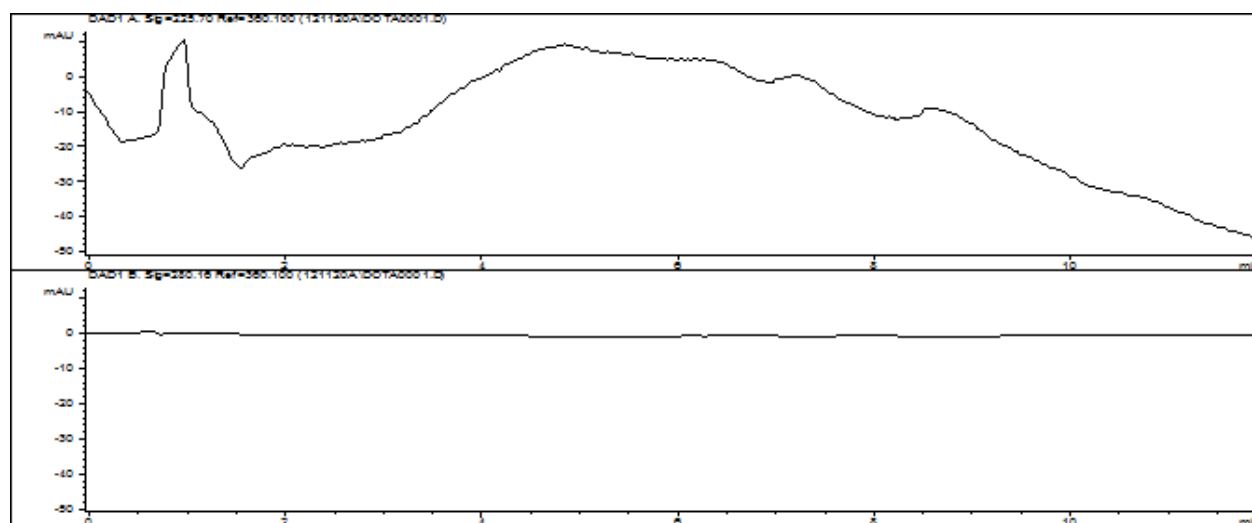
VEDLEGG 4: HPLC kromatogram for 10 mM Lu^{3+} løsnig.



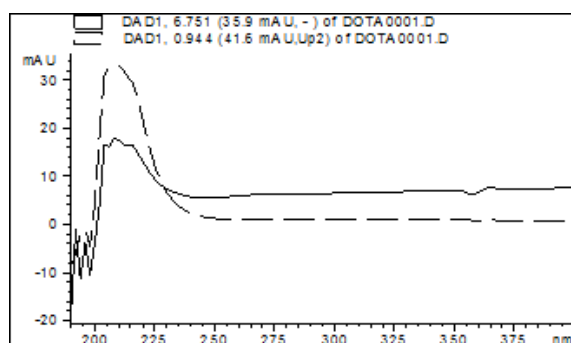
UV-absorbansspekter:



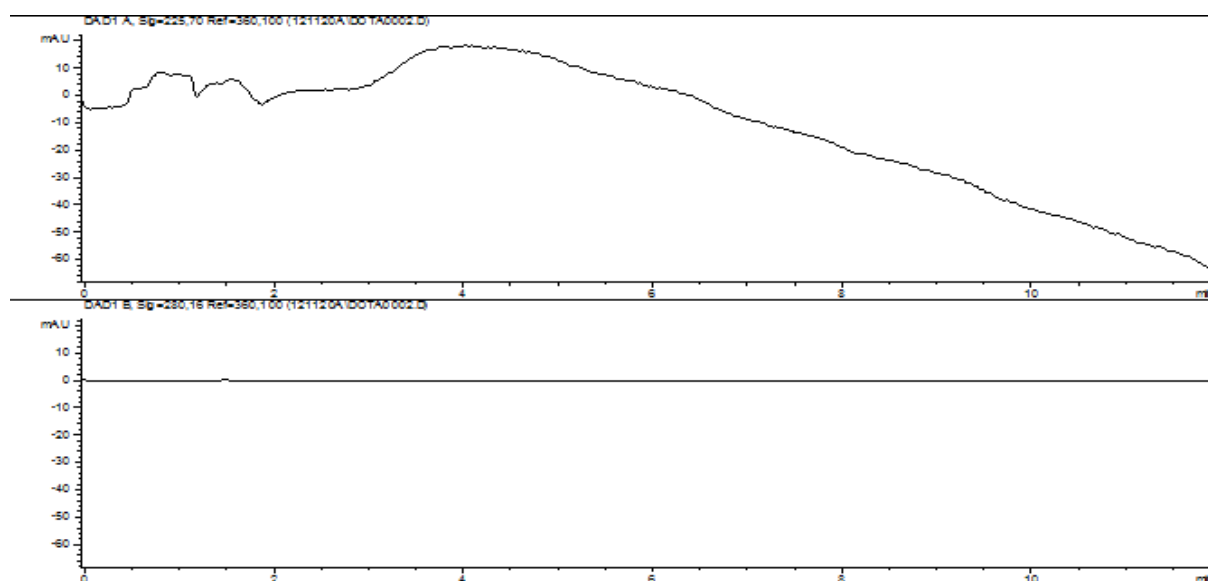
VEDLEGG 5: HPLC kromatogram for LD-A.



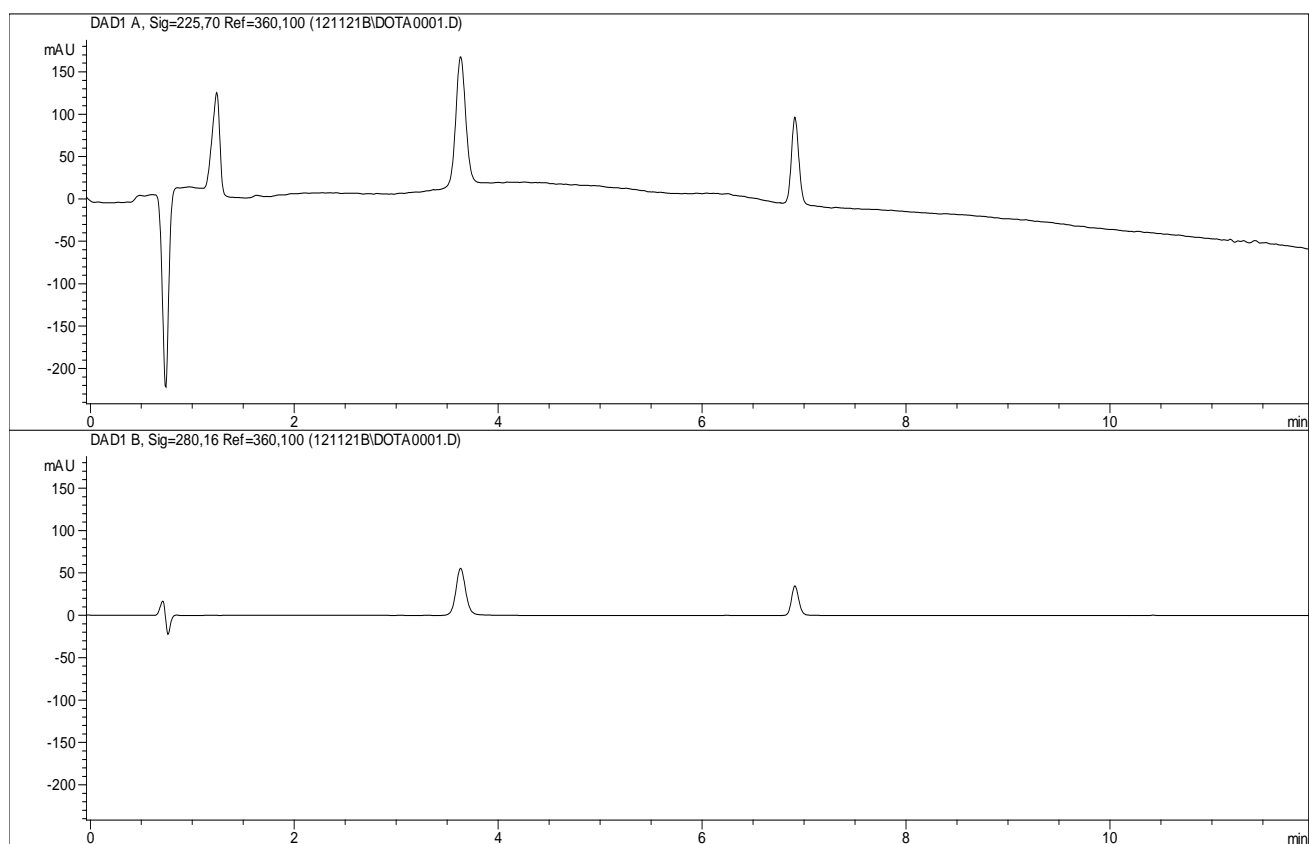
UV-absorbansspekter for toppen:



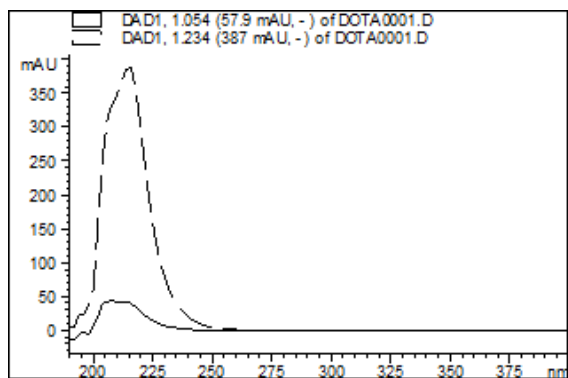
Andre eluering:



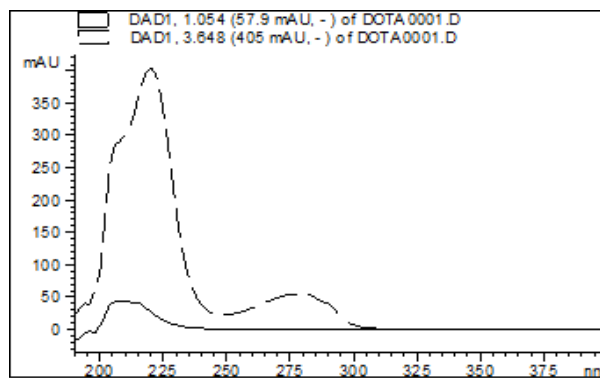
VEDLEGG 6: HPLC kromatogram for LD-B:



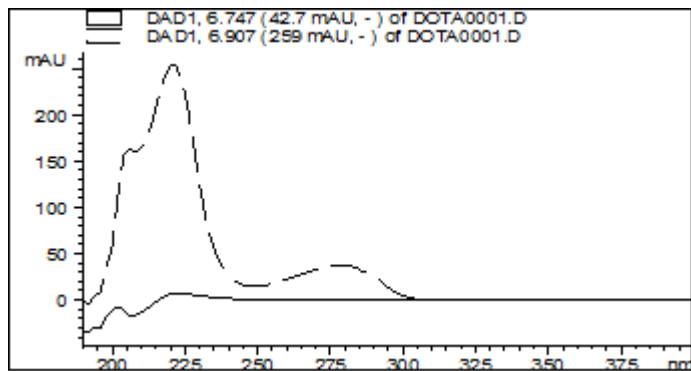
Første toppen:



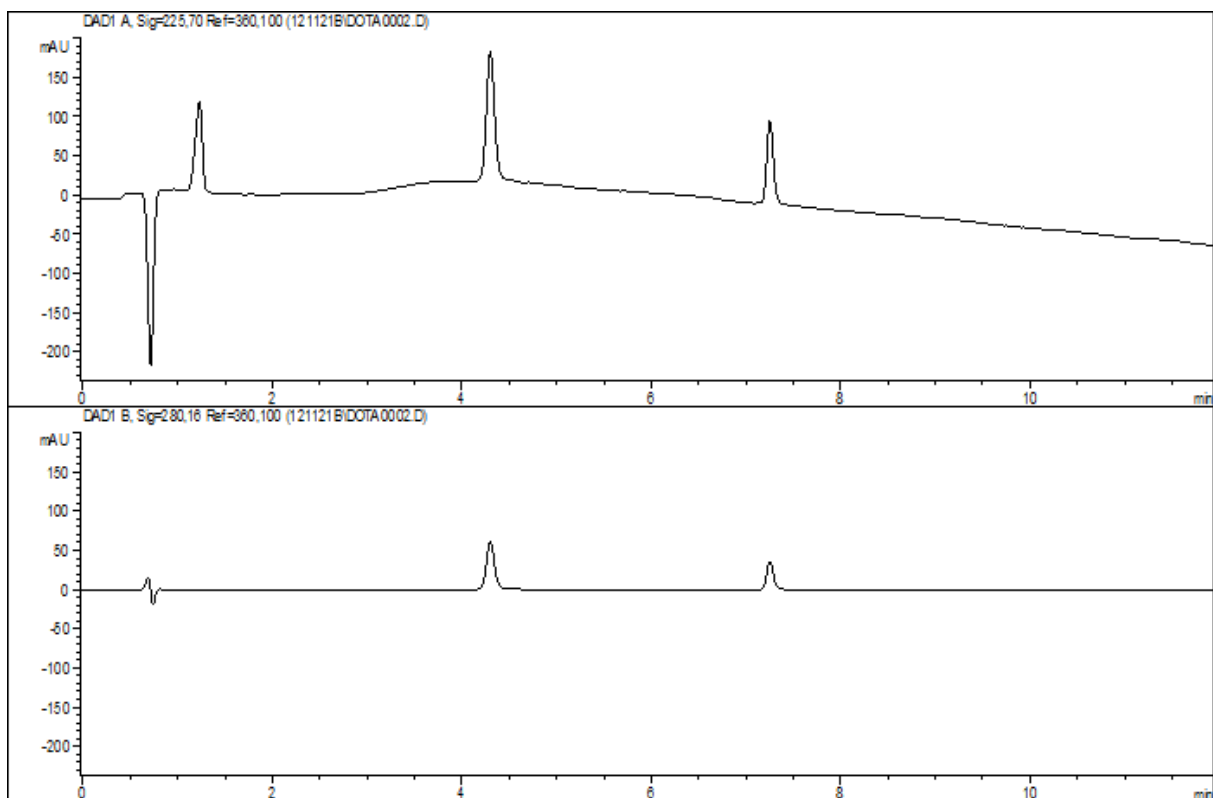
Andre toppen:



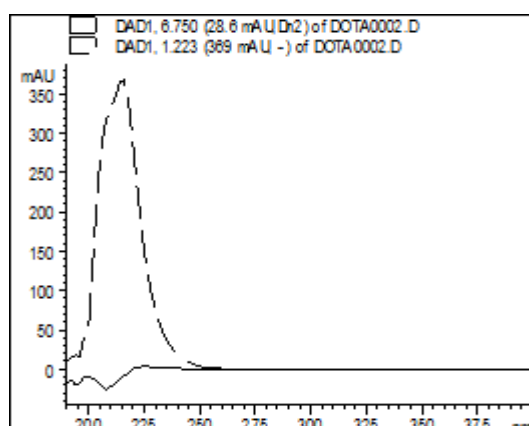
Tredje toppen:



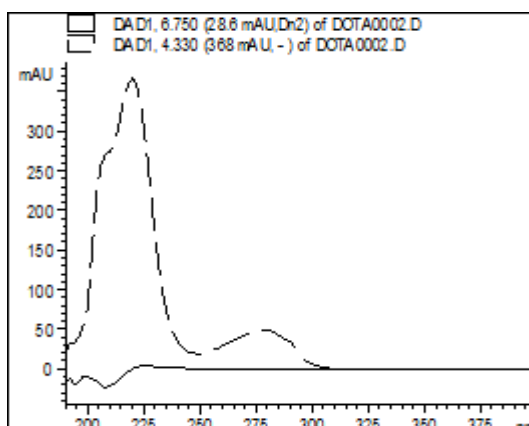
Andre eluering av LD-B:



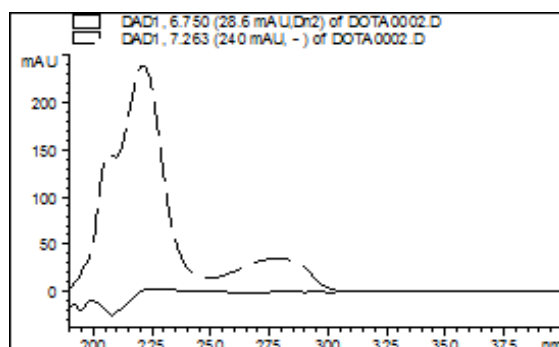
Første toppen:



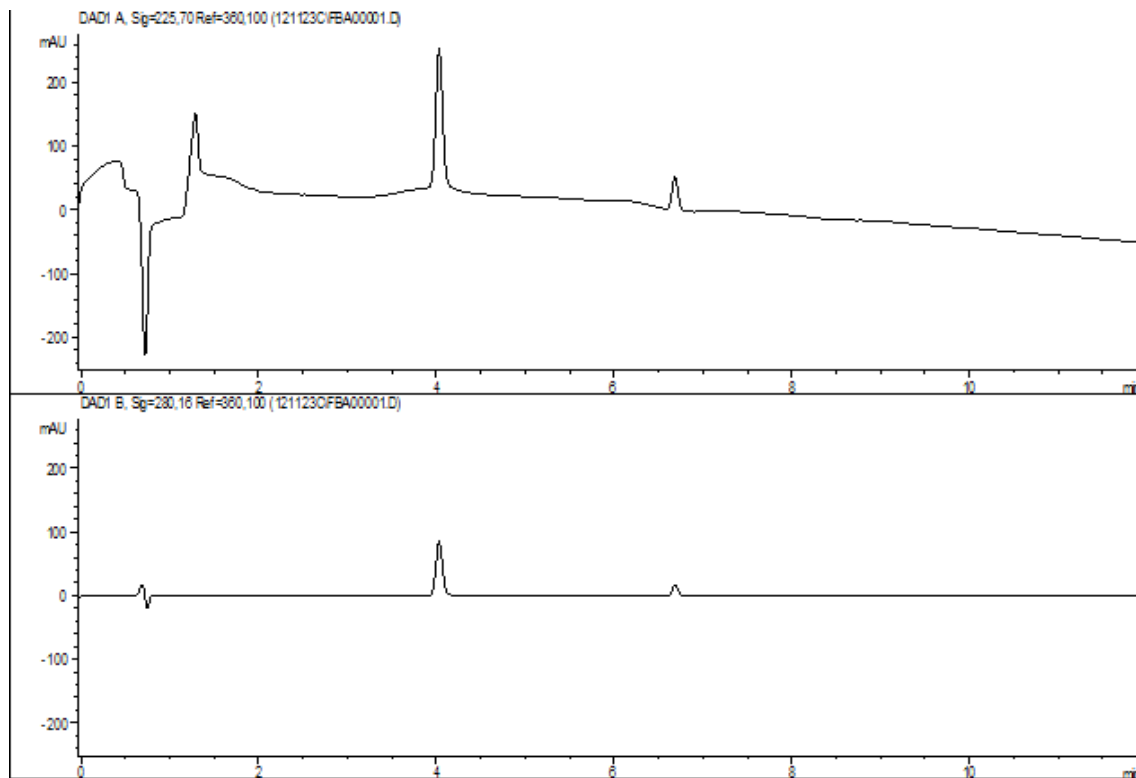
Andre toppen:



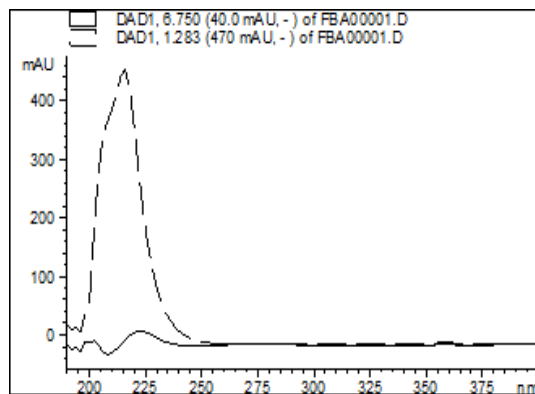
Tredje toppen:



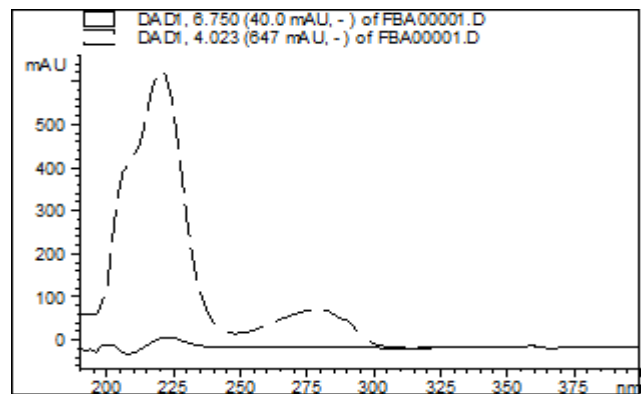
Eluering av LD-B etter tre dager:



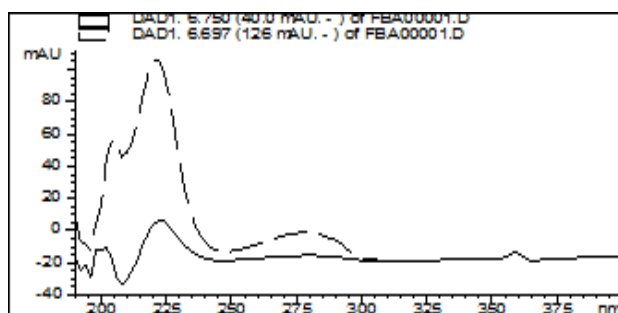
Første toppen:



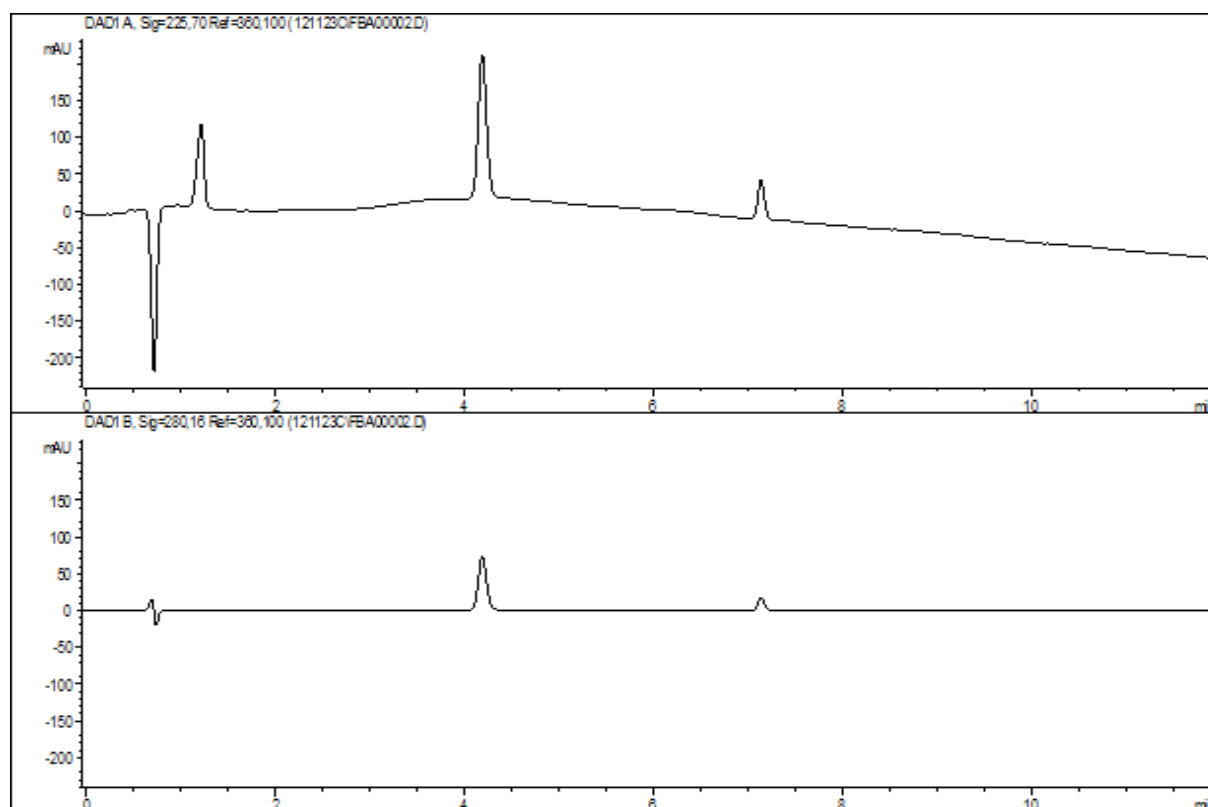
Andre toppen:



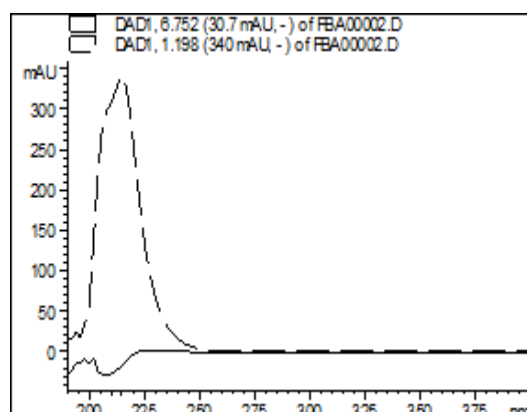
Tredje toppen:



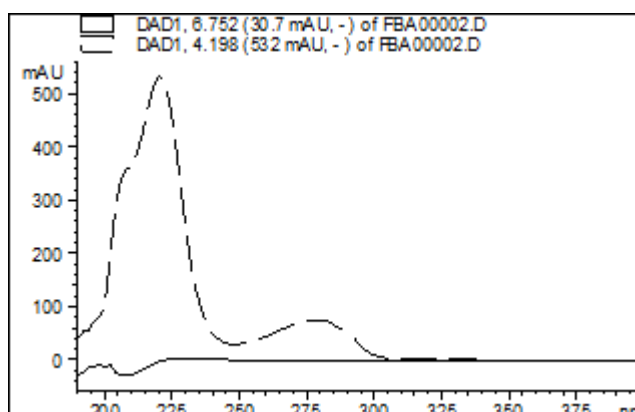
Andre eluering av LD-3 etter tre dager:



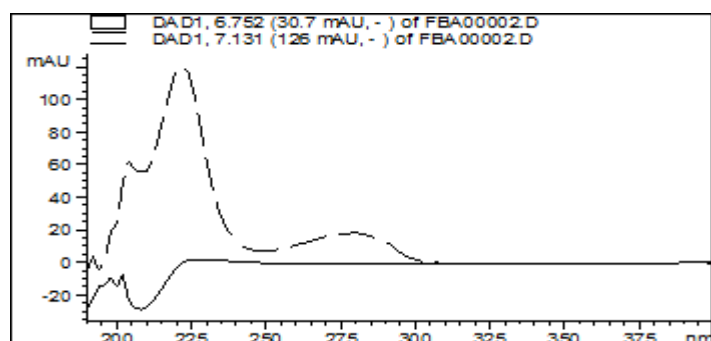
Første toppen:



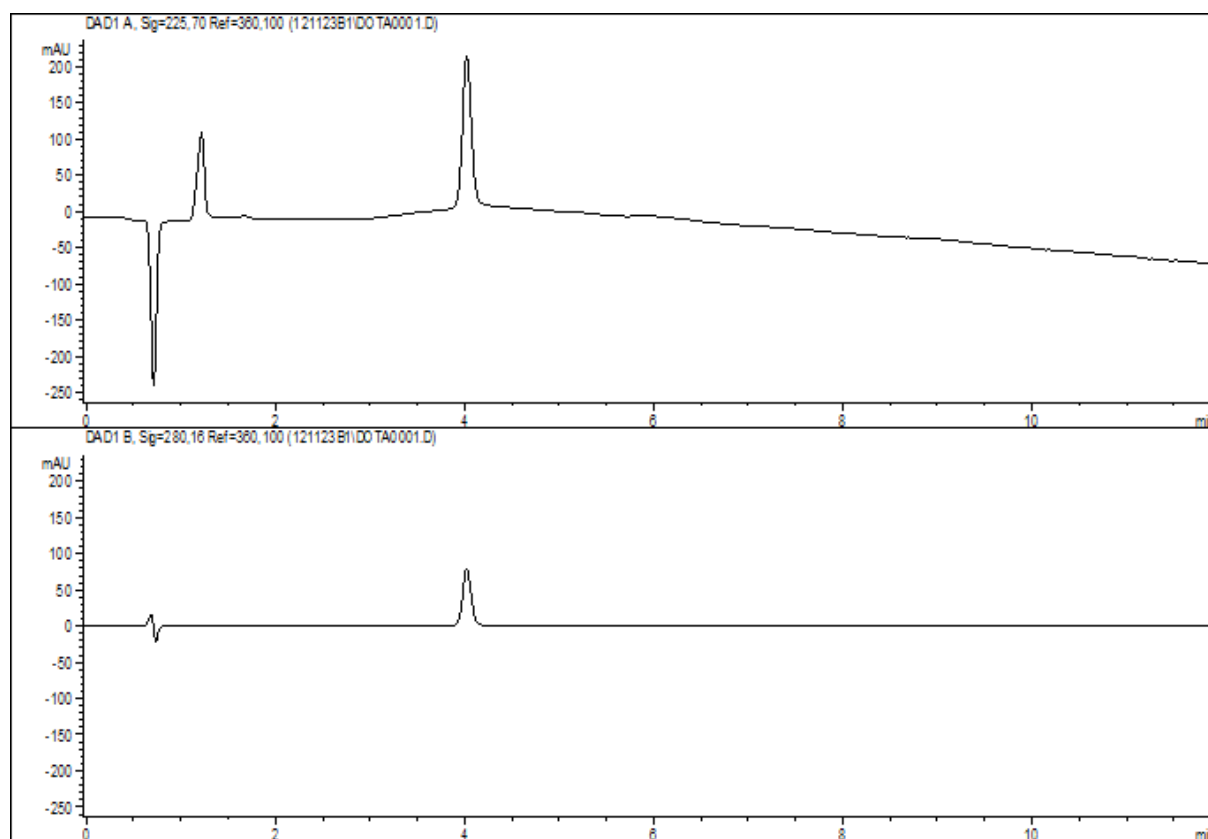
Andre toppen:



Tredje toppen:

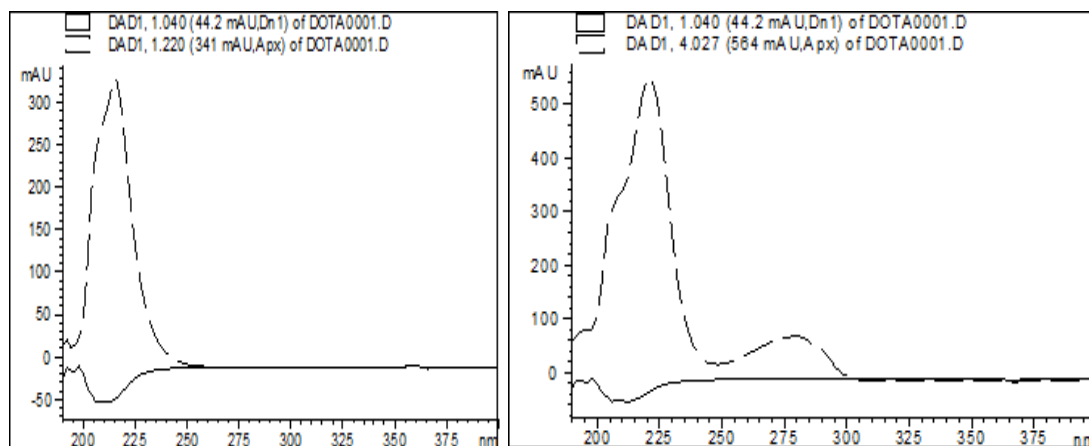


VEDLEGG 7: HPLC kromatogram for LD-C

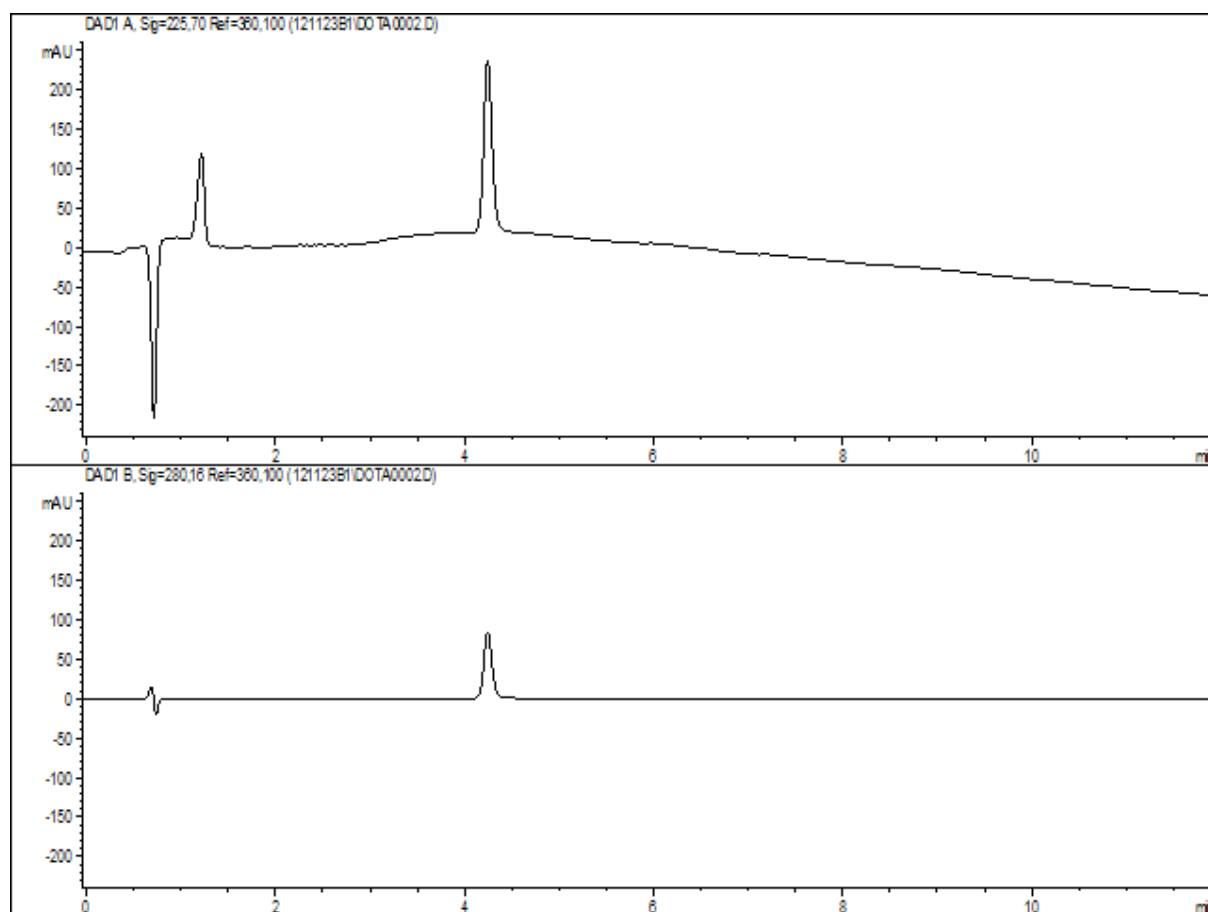


Første toppen:

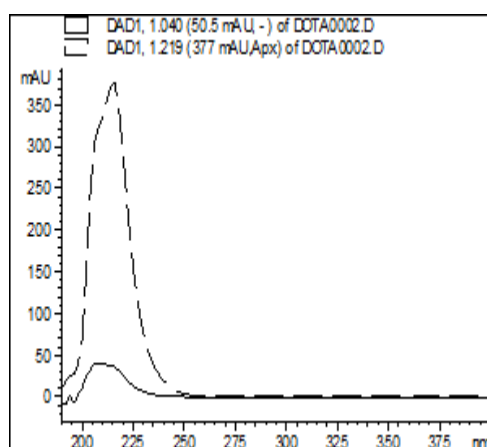
Andre toppen:



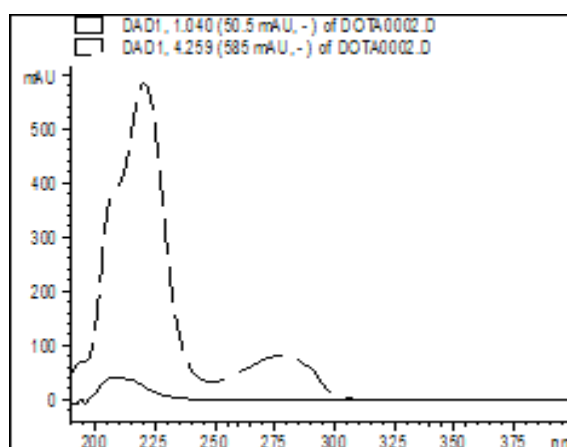
Andre eluering av LD-C:



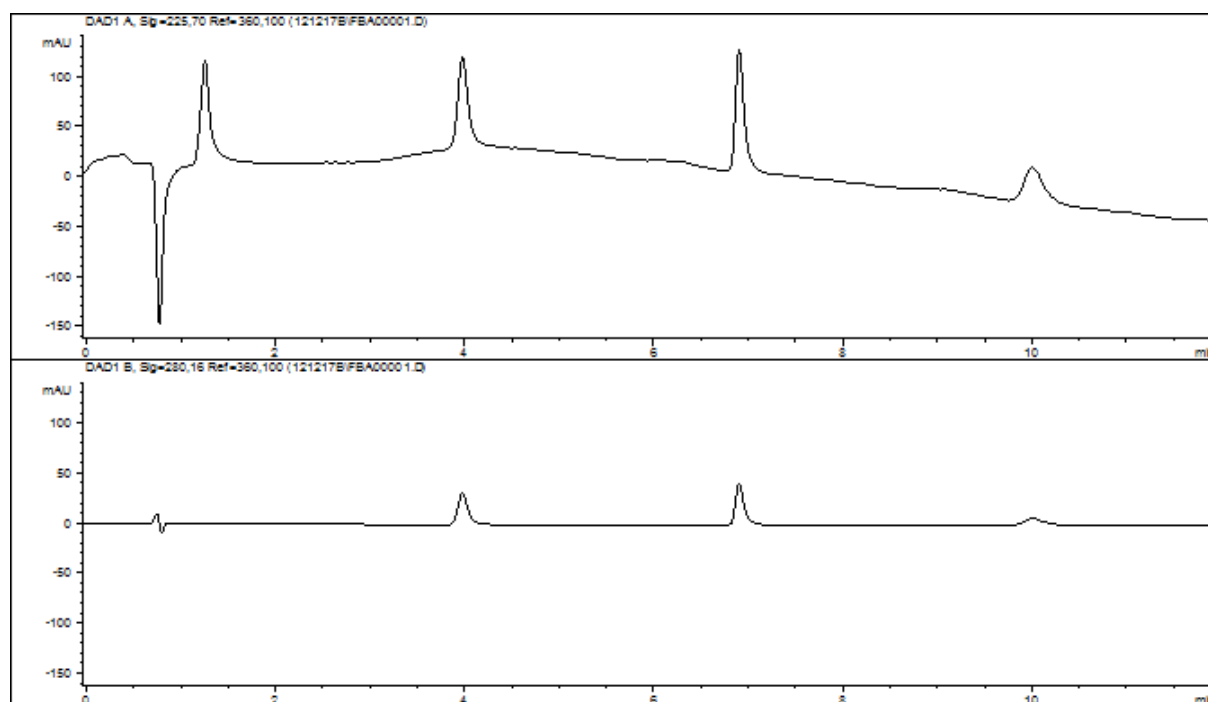
Første toppen:



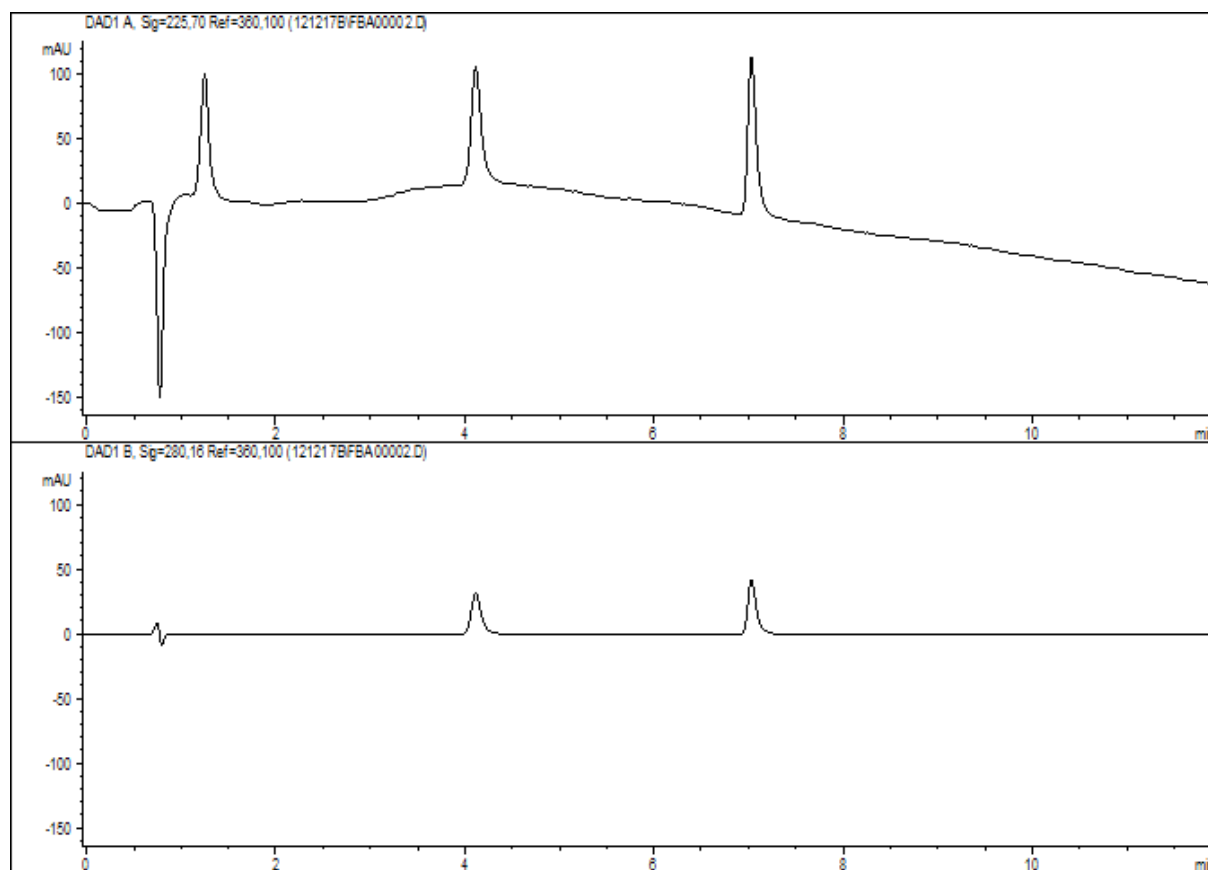
Andre toppen:



VEDLEGG 8: HPLC kromatogram for LD-D.



Andre eluering av LD-D:



VEDLEGG 9: Tabell med kompleksandel for alle parallellene til forsøkene ved romtemperatur.

Kompleksandel, %	Dag 0	Dag 1	Dag 4	Dag 5	Dag 6	Dag 7	Dag 8
Løsning A, gj.	99,4 %						
Forsøk 1.1	99,2 %	94,7 %	89,3 %	88,9 %	91,2 %	86,3 %	84,8 %
Forsøk 1.2	99,1 %	97,5 %	94,1 %	92,5 %	92,6 %	90,0 %	89,1 %
Forsøk 1.3	99,4 %	97,2 %	93,8 %	91,8 %	91,4 %	89,0 %	86,1 %
Gj. av forsøkene	99,2 %	96,5 %	92,4 %	91,1 %	91,7 %	88,4 %	86,7 %
Standardavvik	0,20 %	1,5 %	2,7 %	1,9 %	0,80 %	1,9 %	2,2 %
Forsøk 2.1	99,4 %	98,9 %	97,9 %	97,8 %	96,9 %	97,2 %	96,5 %
Forsøk 2.2	99,5 %	98,5 %	94,7 %	92,5 %	89,6 %	87,4 %	84,8 %
Forsøk 2.3	99,3 %	98,2 %	98,6 %	97,9 %	97,7 %	96,8 %	97,1 %
Gj. av forsøkene	99,4 %	98,5 %	97,0 %	96,1 %	94,7 %	93,8 %	92,8 %
Standardavvik	0,10 %	0,30 %	2,0 %	3,1 %	4,5 %	5,5 %	6,9 %
Forsøk 3.1	98,5 %	99,0 %	99,1 %	99,0 %	98,7 %	98,7 %	99,1 %
Forsøk 3.2	99,5 %	99,2 %	99,1 %	98,9 %	98,7 %	99,1 %	99,0 %
Forsøk 3.3	99,1 %	98,9 %	99,2 %	99,0 %	98,9 %	99,0 %	99,0 %
Gj. av forsøkene	99,0 %	99,0 %	99,1 %	99,0 %	98,8 %	98,9 %	99,0 %
Standardavvik	0,50 %	0,20 %	0,10 %	0,10 %	0,10 %	0,20 %	0,00 %
Forsøk 4.1	92,1 %	97,4 %	95,6 %	93,4 %	94,4 %	93,9 %	92,9 %
Forsøk 4.2	96,5 %	97,5 %	95,5 %	93,4 %	93,8 %	93,2 %	93,0 %
Forsøk 4.3	78,1 %	97,8 %	95,1 %	93,7 %	91,9 %	92,3 %	91,7 %
Gj. av forsøkene	88,9 %	97,6 %	95,4 %	93,5 %	93,4 %	93,1 %	92,5 %
Standardavvik	9,6 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	1,3 %	0,80 %	0,70 %

VEDLEGG 10: Tabell med kompleksandel for alle parallellene til forsøkene ved 40 °C.

Kompleksandel, %	t = 0 h	Etter 5,5 h	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4
Løsning A1, gj av komp.	98,3 %					
Forsøk 5.1		99,0 %	98,4 %	99,1 %	99,5 %	99,0 %
Forsøk 5.2		99,0 %	98,2 %	98,8 %	98,6 %	99,0 %
Forsøk 5.3		99,0 %	98,7 %	99,5 %	97,9 %	99,0 %
Gj, av forsøkene		99,0 %	98,4 %	99,1 %	98,7 %	99,0 %
standardavvik		0,00 %	0,20 %	0,30 %	0,80 %	0,00 %
Forsøk 6.2		98,8 %	97,4 %	95,7 %	99,1 %	98,6 %
Forsøk 6.3		99,1 %	98,9 %	97,3 %	99,3 %	98,9 %
Gj.		99,0 %	98,1 %	96,5 %	99,2 %	98,8 %